

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Caractérisation de la kinase associée à la cycline Pch1 chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*

Lamesch, Philippe

Award date:
2000

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Caractérisation de la kinase associée à la cycline Pch1 chez
la levure *Schizosaccharomyces pombe***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

par

Philippe Lamesch

Juin 2000

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Jean Vandenhoute pour m'avoir accueilli dans son laboratoire .

Merci aux membres du jury, Anne Tibor, Léon Dirick, Sabine Pirotton et Pierre Devos pour avoir consacré du temps à la lecture de ce mémoire.

Je remercie B. Furnari, M. Vidal, T. Mäkelä et G. Cottarel pour les souches et les plasmides qu'ils m'ont fournis.

Damien, merci pour la grande patience que tu montrais envers moi pendant les 6 mois que j'ai passé dans ce labo..

Un grand merci aussi à Sophie pour les nombreuses heures qu'elle a consacré pour m'aider dans mon travail.

Merci à tous les gens du labo qui grâce à leurs caractères si différents font de ce labo ce qu'il est:

Isabelle, merci pour le T-shirt et l'ordinateur,

Flore, merci....sans toi nous n' aurions jamais trouvé le chemin au théâtre,

Monique, merci pour avoir toujours eu un regard veillant sur moi,
Rose-Marie, merci pour ta bonne humeur qui rayonne toujours au labo,

Vincent, merci pour nos nombreuses discussions nocturnes,

Max, merci.....si je saute, c'est grâce à toi,

Ach so! Merci à toi aussi Godefroid.

Je tiens également à remercier mon père pour m'avoir encouragé à me lancer dans le monde de la génétique, aussi bien que ma mère, mon frère et ma grand-mère qui étaient là pour moi pendant les bonnes périodes aussi bien que les plus difficiles.

Enfin je tiens à remercier tous les gens qui m'ont accueilli à bras ouverts ici en Belgique et grâce auxquels je vais toujours avoir un bon souvenir de Namur:

Merci Amélie, Cindy, Benoît, Lionel et tous les autres.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Caractérisation de la kinase associée à la cycline Pch1 chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*

LAMESCH Philippe

Résumé

Les cyclines C appartiennent à une famille de cyclines peu caractérisée n'intervenant pas dans le cycle cellulaire. Les trois complexes CDK/cycline de *Saccharomyces cerevisiae*, Kin28/Ccl1, Srb10/Srb11 et Ctk1/Ctk2, dont seul le premier est essentiel, interviennent au niveau de la régulation transcriptionnelle par l'ARN polymérase II.

La situation chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* contraste avec celle de *S. cerevisiae*. L'homologue de Kin28/Ccl1 est Mcs6/Mcs2 lui aussi essentiel. Une analyse par BLAST révèle que le génome de *S. pombe* contient les orthologues fonctionnels probables de Srb11 et Ctk2. Curieusement une quatrième cycline C, Pch1, est présente chez *S. pombe*. Elle est essentielle, mais reste à ce jour orpheline.

Le but de ce mémoire est la caractérisation du partenaire de Pch1 pour éclairer le rôle de ce complexe kinase/cycline propre à *S. pombe*.

Dans une première partie, nous avons testé l'hypothèse que Mcs6 soit le partenaire kinase de Pch1. Nos résultats montrent que Pch1 ne co-précipite pas Mcs6 et que la surexpression de Mcs6 n'affecte pas l'activité kinase co-précipitée avec Pch1. Ces données semblent donc indiquer que Mcs6 n'est pas le partenaire de Pch1 *in vivo*.

Dans la seconde partie du travail, nous avons réalisé un crible double-hybride dans le but d'isoler des partenaires de la cycline Pch1. Parmi les candidats séquencés à ce jour, deux sont biologiquement apparentés dans le pathway contrôlé par la protéine Ras1 et un de ces candidats encode la kinase Spk1.

Ces résultats posent la question de l'association de Pch1 et Spk1 et d'un rôle de Pch1 dans le pathway "Ras" chez *S. pombe*.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2000

Promoteur: Professeur J. Vandenhoute, Laboratoire de Génétique Moléculaire, U.R.B.M.

INTRODUCTION

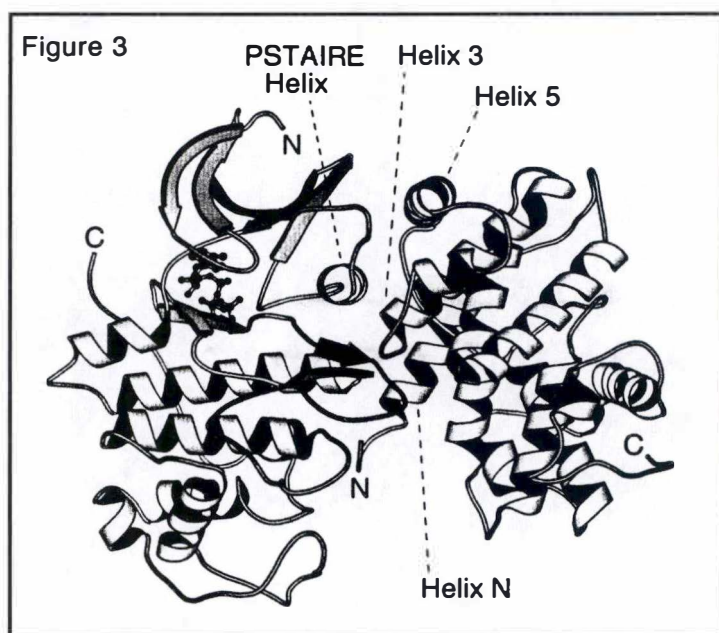
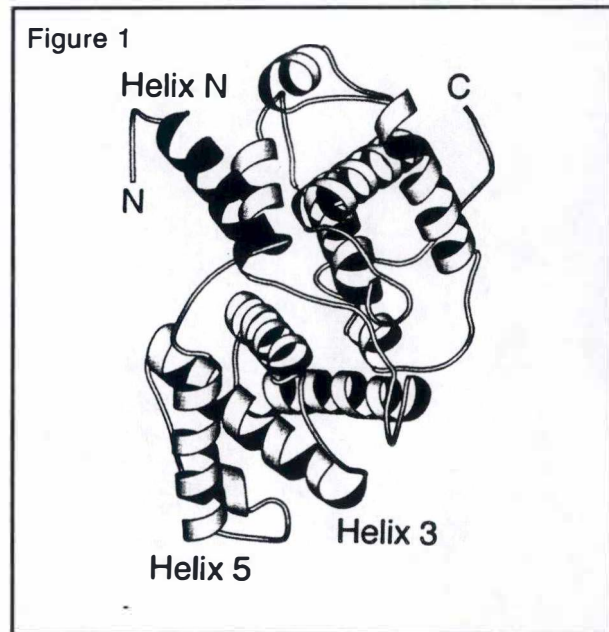
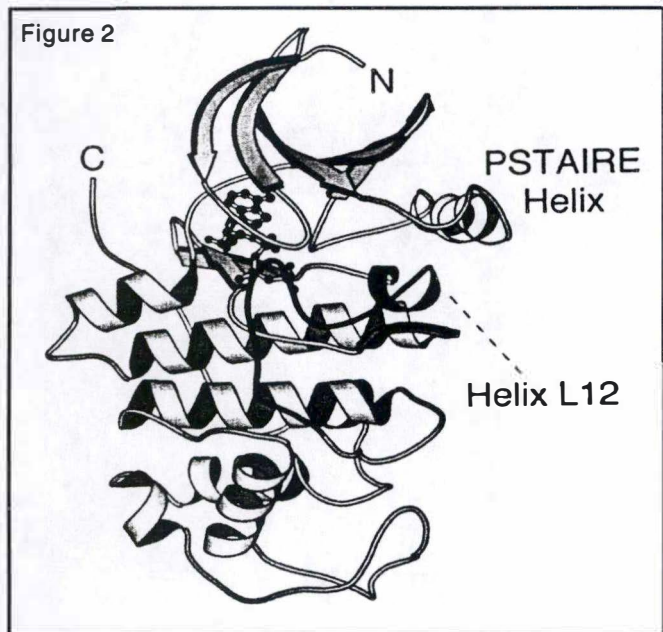


Figure 1: Structure de la cycline A humaine (à laquelle manque les 172 premiers résidus) (Brown *et al.*, 1995; Jeffrey *et al.*, 1995). Les 5 hélices de la partie inférieure constituent le motif "cyclin box"

Figure 2: Structure de la kinase CDK2 humaine complexée à l'ATP (De Bondt *et al.*, 1993). La partie supérieure de la protéine contient des plans beta et l'hélice PSTAIRE. La partie inférieure contient essentiellement des hélices alpha. Le "T-loop" est représenté en noir et cache le site catalytique qui est inaccessible au substrat. La molécule d'ATP est représentée au niveau du site catalytique.

Figure 3: Structure du complexe CDK2-Cycline A-ATP (Jeffrey *et al.*, 1995). La cycline est basculée de 90°C par rapport à la figure 1. Le "T-loop" a subi un déplacement par rapport à la figure 2 suite à l'interaction cycline/CDK. L'interaction entre CDK2 et la cycline A implique l'hélice PSTAIRE de CDK2 et les hélices 3 et 5 de la cycline A. Par ailleurs, le domaine C-terminal de CDK2 interagit avec l'hélice N de la cycline A. (extrait de Morgan, 1997).

1. Vue d'ensemble des cyclines et des CDK

1.1. Structures et mécanismes

Les cyclines ont d'abord été reconnues comme une famille de protéines intervenant dans la régulation du cycle cellulaire (Morgan, 1997). Cependant, vu le nombre croissant de cyclines identifiées comme n'intervenant pas dans le cycle cellulaire, la définition de cyclines et leur classement en familles distinctes ne se fonde plus sur des caractères fonctionnels mais seulement sur des homologies de séquences et de structures. Toutes les cyclines, dont la taille varie entre 35 et 90 kDa, partagent une même région d'environ 100 acides aminés nommée la « cycline box ». Les cyclines peuvent être subdivisées en sous-groupes (cycline A,B,C,...), basées sur leur homologie dans la cycline box (Morgan, 1997). Les cyclines A, B, D1 et E présentent une similarité de séquence de 30-50% dans cette région alors que la cycline-box des cyclines C partage beaucoup moins de similarités avec ces dernières (Leclerc and Leopold, 1996).

C'est par l'intermédiaire de la cycline box que les cyclines interagissent avec les protéines de la famille des CDK (cyclin dependent kinases). Les variations de séquence entre les cycline box des différentes cyclines permet une interaction spécifique et la formation de différents couples cycline-CDK (Morgan, 1997). Le motif structural correspondant à la cycline box a été caractérisé par cristallographie de la cycline A (Jeffrey *et al.*, 1995). Ce motif est formé de 5 hélices (**figure 1**). Les cyclines A et B partagent une région d'homologie supplémentaire, appelée la « destruction box », qui, ubiquitinée, est reconnue par le protéasome dégradant alors la cycline dont la concentration varie ainsi dans le cycle cellulaire (Morgan, 1997).

Les CDK appartiennent à la superfamille des kinases et phosphorylent spécifiquement les sérines et thréonines suivies d'une proline. Grâce aux travaux de cristallographie qui ont été menés dans le cadre de l'étude de l'interaction CDK2/cycline A, on sait que les CDK sont formées de 2 lobes : le premier est riche en plans β alors que le deuxième contient surtout des hélices α (**figure 2**) (De Bondt *et al.*, 1993; Jeffrey *et al.*, 1995; Russo *et al.*, 1996). Entre ces 2 lobes se trouvent le site catalytique et le site de fixation de l'ATP contenant des résidus conservés chez toutes les protéines kinases eucaryotes.

Tant que la CDK n'est pas liée à son partenaire cycline, des contraintes structurales entraînent l'inactivité de la kinase. Ainsi, chez la CDK libre, le site de liaison au substrat est bloqué par un loop prolongé appelé « T-loop ». De plus, les chaînes latérales des acides aminés impliqués dans la liaison de la molécule d'ATP sont orientées de manière à ne pas permettre le transfert d'un phosphate de la molécule d'ATP sur le substrat (Jeffrey *et al.*, 1995; Russo *et al.*, 1996).

Sur base de la structure de CDK2/cycline A, il a été proposé que les cyclines activent les CDK par interaction avec les 2 lobes des kinases, pour former un interface protéine-protéine

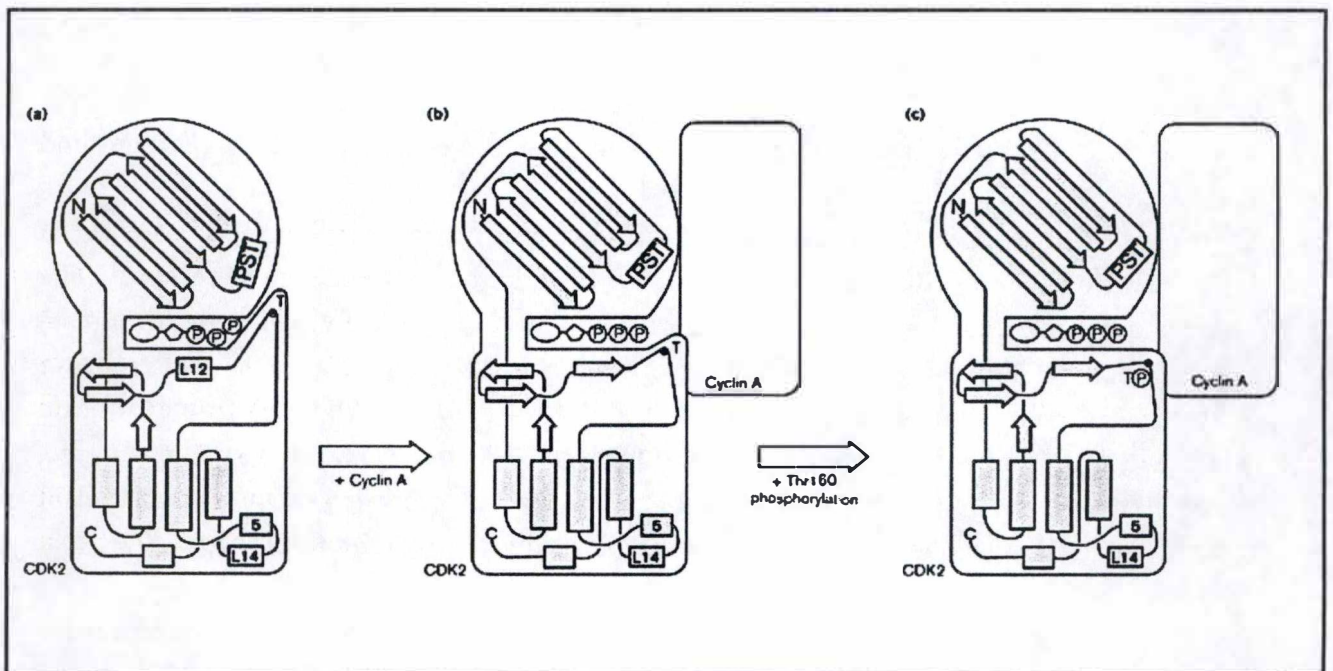


Figure 4: Représentation schématique de l'activation de CDK2 par la liaison de la Cycline A et la phosphorylation du "T-loop" par la CAK (extrait de Morgan, 1996)

large et continu (**figure 3**) (Jeffrey *et al.*, 1995). Au niveau du lobe supérieur de la CDK2 les hélices α 3 et 5 de la cycline-box interagissent avec le motif PSTAIRE. Suite à cet agencement des différents éléments des 2 protéines, l'hélice PSTAIRE et le T-loop subissent des changements de conformation et de position importants. Le T-loop bascule vers le domaine C-terminal de façon à exposer le substrat au résidu thréonine 161 (d'où le nom de T-loop) (Russo *et al.*, 1996). Pour la majorité des CDK, le T-loop doit être phosphorylé par un autre type de kinase, la CAK (pour cycline dependant kinase activating kinase) pour conférer l'activité maximale à la kinase (Morgan, 1997). Suite aux changements de position du motif PSTAIRE et du T-loop, on observe aussi un réarrangement des résidus du site catalytique, permettant de positionner de façon optimale les phosphates de l'ATP et d'assurer par là un phosphotransfert efficace (**figure 4**) (Morgan, 1996; Russo *et al.*, 1996). Le phosphotransfert correspond à l'échange d'un phosphate de la molécule d'ATP sur un substrat.

1.2. Événements principaux régulés par les complexes CDK/cycline

La réplication, la mitose et la cytokinèse sont régulées par un système de contrôle central dont l'acteur principal est le complexe CDK/cycline. Une série de cyclines sont synthétisées puis dégradées après ubiquitination à des moments précis du cycle cellulaire alors que la concentration des différentes kinases reste stable tout au long de celui-ci (Morgan, 1997). Les CDK nécessitant une interaction avec leur partenaire cycline pour être actives, leur activité sera ainsi régulée par la fluctuation cyclique de la concentration des différentes cyclines.

Les complexes cycline/CDK sont aussi requis dans d'autres contextes comme la régulation métabolique (le système "Pho" (Moffat *et al.*, 2000) chez *S. cerevisiae*) ou le contrôle de la transcription par l'ARN polymérase II (Morgan, 1997).

L'activité transcriptionnelle des gènes eucaryotes, pendant le développement ou en réponse à des signaux extracellulaires, fait intervenir des complexes multiprotéiques au niveau du promoteur et des séquences d'activation et de répression.

La composante protéique principale de la machinerie transcriptionnelle est la RNA polymérase II, complexe multiprotéique qui polymérise les bases nucléotidiques en chaînes d'ARNm au fur et à mesure qu'elle avance sur le brin codant des ORF. Celle-ci s'associe avec des facteurs de transcription généraux (TFII) et d'autres complexes pour former l'holoenzyme. Comme le montre la **figure 5**, la polymérase est sous le contrôle d'activateurs et de répresseurs qui se présentent sous forme de complexes multiprotéiques se liant à l'ADN au niveau des séquences de régulation (Parvin and Young, 1998). Ces complexes agissent sur la polymérase par l'intermédiaire de co-répresseurs et co-activateurs (Hampsey, 1998; Hampsey and Reinberg, 1999).

Trois complexes CDK/cycline ont été identifiés chez *S. cerevisiae* comme intervenant dans la régulation transcriptionnelle (Cismowski *et al.*, 1995; Kuchin *et al.*, 1995; Sterner *et al.*, 1995; Valay *et al.*, 1995). Les cyclines de ces trois complexes font toutes parties de la famille des cyclines de type C (Leclerc and Leopold, 1996; Leopold and O'Farrell, 1991).

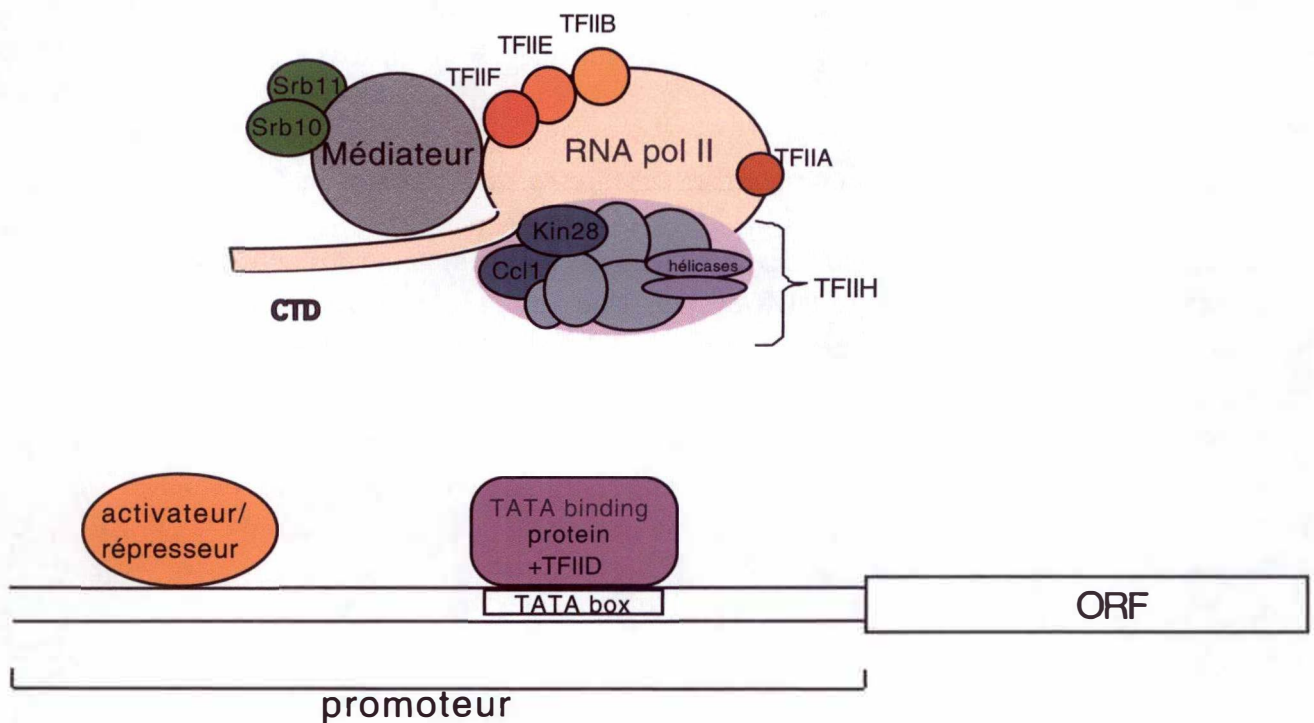


Figure 5: Complexe multiprotéique régulant la transcription chez la levure (exemple de *S. cerevisiae*). Ce complexe regroupe 4 types protéiques:

- La RNA polymérase II polymérise l'ARNm
- Les facteurs de transcription généraux qui sont essentiels pour la transcription mais incapables à eux seuls de réguler la transcription
- Les régulateurs (activateurs et répresseurs) qui varient d'un gène à l'autre
- le médiateur, qui joue le rôle d'intermédiaire entre les régulateurs et la RNA pol II

2. La famille des cyclines de type C

2.1. Etat de la question chez les levures

Les différentes cyclines de type C partagent des traits communs qui les distinguent des autres sous-familles de cyclines : elles présentent une homologie de séquence modérée au niveau de leur cycline box, mais très peu d'homologie avec les autres sous-familles de cyclines. Contrairement aux autres types de cyclines, la concentration des cyclines de type C ne fluctue pas pendant le cycle cellulaire d'où l'hypothèse que ce type de cycline n'a pas de rôle dans le cycle cellulaire (Leclerc and Leopold, 1996; Leopold and O'Farrell, 1991). Enfin, les partenaires kinases de la cycline C humaine et de la Drosophile, mais aussi leurs homologues chez *S. cerevisiae*, montrent tous un même échange du motif PSTAIRE en S(M/Q)SACRE (Leclerc and Leopold, 1996). Ainsi, les cyclines C représentent une sous-famille de cyclines qui a probablement évolué indépendamment des autres familles de cycline. Les tableaux ci-dessous comparent les complexes CDK/cyclines C chez *S. cerevisiae* et chez *S. pombe* :

S. cerevisiae

	CDK	Cycline C
Essentiel	Kin28	Ccl1
Non-essentiel	Srb10	Srb11
Non-essentiel	Ctk1	Ctk2
	/	/

S. pombe

	CDK	Cycline C
Essentiel	Mcs6	Mcs2
Non-essentiel	Prk1	*SPBC12D12.06
	*SPAC2F3.15	*SPBC530.13
Essentiel	Cdc2 ??	Pch1

* ORF obtenue par alignement de séquences dans le programme BLAST (voir en annexe)

2.2. Description de la protéine Pch1

Le gène *pch1* encode une protéine de 342 acides aminés correspondant à une masse approximative de 38000 daltons (Furnari *et al.*, 1997). La séquence du gène est interrompue par 2 introns qui ont une longueur de 57 et 43 bp (Sanchez *et al.*, 1999).

Parmi les eucaryotes supérieurs, la cycline Pch1 montre le plus d'identité de séquence avec les cyclines C de *Drosophila melanogaster* et de l'homme (35% et 33% respectivement) et cela surtout dans les régions 1,2 et 4 de la cycline box (**figure 6**). Les protéines de levure qui montrent le plus d'homologie de séquence dans la cycline box avec Pch1 sont les cyclines C Srb11 (20%), Ccl1 (17%) et Ctk2 (21%) de *S. cerevisiae*. La cycline H de l'homme, et la cycline Mcs2 de *S. pombe* sont d'autres protéines présentant une homologie de séquence avec Pch1 (voir tableau 1) (Furnari *et al.*, 1997).

MSEVIKSVPP	GSQNTSQWII	SKDQLVFT-P	SALDGIPLDQ	EEIQRSKGCN	49		
MAGNFW----	QSSHSQQWIL	DKPDLLRERQ	HDLLALNEDE	YQKVFIFFAN	46		
FIINV	GLRLK	LPQTALATAN	IYFHRFYLR	SLKNYHYEY	AATCIFLATK	99	
VIQVL	GEQLK	LROQVIATAT	VYFKRFYARN	SLKNIDPLLL	APTCILLASK	96	
Région 1 54%			région 2 64%				
VEDSVRKL	RD	IVINCAKVAQ	KNSNVLVDEQ	TKEYWRWRDV	ILYTEEVILLE	149	
VEEFGVISNS	RLISICQ S	AI	KTKFSYAYAQ	EFPY - -	RTNH	ILECEFYILLE	144
Région 3 31%							
ALCFDFTGEH	PYPYVLSFIK	KFVADDKNVT	KVAWTYINDS	TRSIACLLY S	199		
NLDCCLIVYQ	PYRPLLQLVQ	D-MGQEDQLL	TLSWRIVNDS	LRTDVCLLYP	193		
région 4 44%							
PKTIAAAAFQ	FALEKNEINL	STTTDGLPVW	MEESEQVSYED	VKGVLTLLIDS	249		
PYQIAIACLO	IA	----	CVIL - -	QKDATKQW	FAELNVDLDK	VQEIVRAIVN	237
LYKKI N P S KQ	ALPIDQKNGS	HASSVAPGTP	SSLASVSTQA	TPQHQNSSGR	299		
LYELWKDWKE	-----	-----	-----	-----	247		
TDSFHS	LNTE	TPSKSTVDDQ	ILSTAAQPKK	SSDTEKEMET	EAS	342	
-----	---	KDEI - QM	LLSKIPKPKP	PPQR	265		

Figure 6: Comparaison des séquences de Pch1 avec la Cycline C (de la Drosophile). La séquence supérieur correspond à Pch1 et la séquence inférieure à la cycline C. Les acides aminés identiques sont marqués en rouge. Les régions 1-4 de la "cyclin box" sont soulignées et le pourcentage d'identité de chaque région est indiqué.

Sur base des homologies de séquences, Pch1 pourrait représenter la cycline homologue de Srb11 ou de Ctk2 (20 et 21% d'homologie dans la cycline box" respectivement). Cependant, *pch1* est un gène essentiel contrairement à *SRB11* et *CTK2*, ce qui permet de penser que Srb11 ou Ctk2 ne sont pas des homologues fonctionnels de Pch1.

En conclusion, *S. pombe* possède donc deux cyclines de type C essentielles (Mcs2 et Pch1) contrairement à *S. cerevisiae* où seul Ccl1 est essentiel pour la croissance.

Des spores qui portent l'allèle *pch1* disrupté peuvent germer normalement pour former des microcolonies qui sont non-viables et qui présentent des phénotypes variables. Ces cellules sont "gonflées" et présentent trois défauts morphologiques principaux :

- Aggrégation des mitochondries
- Malformation septale
- Ségrégation anormale du matériel chromosomique avec, comme conséquence, des cellules ne contenant pas de noyau et d'autres contenant 2 noyaux.

Pch1 ne semble pas avoir pour rôle de réguler une des phases du cycle cellulaire. En effet le mutant $\Delta pch1$ ne présente pas de phénotype "*cdc*" (cell division cycle) caractérisé par le fait que les cellules continuent à croître sans pour autant être capables de se diviser.

La cycline de type C Pch1 a été découverte par l'équipe de Paul Russell lors d'un crible double-hybride utilisant Cdc2 comme appât (Furnari *et al.*, 1997). La kinase Cdc2, qui interagit avec une série de cyclines de type B, intervient aussi bien à la transition G1/S que G2/M du cycle cellulaire. Un des candidats clonés lors de ce crible a été identifié par homologie de séquence de la cycline box, comme étant une cycline C, d'où son nom Pch1, pour *pombe cyclin C homology*.

Bien que Cdc2 interagisse avec Pch1 en crible double-hybride, les données suivantes remettent en question cette interaction *in vivo* :

- 1° Tous les partenaires connus de Cdc2 sont des cyclines B alors que Pch1 est une cycline C.
- 2° Aucune interaction entre une CDK du cycle cellulaire et une cycline C n'a été trouvée jusque maintenant.
- 3° Cdc2 est une CDK à motif PSTAIRE alors que toutes les cyclines de type C connues interagissent avec des CDK à motif SACRE.

Une série d'expériences ont été réalisées par l'équipe de Paul Russell pour savoir si l'interaction Cdc2/Pch1 reflétait une interaction fonctionnelle *in vivo* (Furnari *et al.*, 1997).

Test de l'activité kinase du partenaire de Pch1

A l'aide d'un sérum anti-Pch1, on a pu co-précipiter les protéines associées à Pch1 pour tester leur activité kinase sur les trois substrats suivants : Myelin Basic Protein (MBP), un peptide correspondant au CTD de la RNA polymérase II et l'histone H1. Ces trois protéines sont connues pour être phosphorylés *in vitro* par Cdc2. Cette expérience a montré que l'activité

kinase précipitée par Pchl est assez faible pour ces substrats, la MBP étant la protéine qui fut le plus phosphorylée.

Co-purification Pchl/Cdc2

La détection avec des anticorps anti-Cdc2 dirigés contre des protéines co-immunoprécipitées avec Pchl donne un signal très faible ce qui suggère que Pchl ne précipite qu'avec une très petite fraction de Cdc2.

Western avec détection anti-PSTAIRE

Des anticorps anti-PSTAIRE ne détectent aucun signal avec les protéines que Pchl a co-immunoprécipitées ce qui suggère l'absence de Cdc2 qui contient ce motif PSTAIRE.

Par ailleurs, la surproduction de Pchl, à température intermédiaire, dans des souches présentant les allèles thermosensibles *cdc2-33* et *cdc2-L7*, ne montre pas la suppression du phénotype mutant. Aucune interaction génétique n'a donc pu être mise en évidence entre Cdc2 et Pchl.

Les résultats de ces différentes expériences suggèrent que Cdc2 n'est pas le partenaire principal de Pchl.

Une explication possible de l'interaction Cdc2/Pchl observé en crible double-hybride serait que Cdc2 est un substrat du complexe CDK/Pchl. La question du rôle et des partenaires de Pchl demeure entière.

3. Questions relatives au rôle de la cycline Pchl chez *S. pombe*

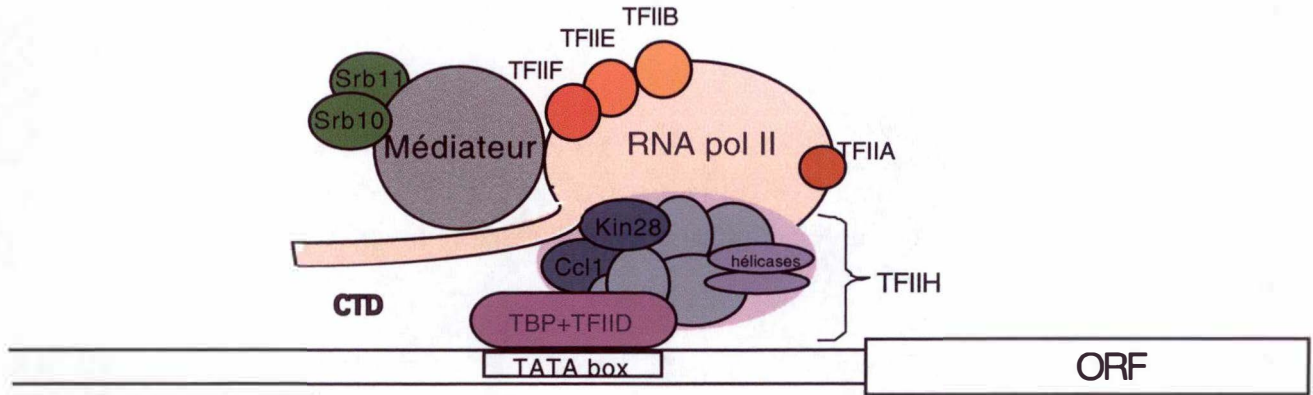
3.1. Références aux données existants dans le système modèle *S. cerevisiae*

S. cerevisiae appartient au groupe des « budding yeast » et *S. pombe* au groupe des « fission yeast ». Chez *S. cerevisiae*, qui représente depuis de nombreuses années un outil formidable en génétique moléculaire, la transcription est mieux étudiée que chez *S. pombe* et trois complexes CDK/cyclines y interviennent : ce sont les couples Kin28/Ccl1, Srb10/Srb11 et Ctk1/Ctk2 (Cismowski *et al.*, 1995; Kuchin and Carlson, 1998; Sterner *et al.*, 1995; Valay *et al.*, 1995).

Comme les trois cyclines C de *S. cerevisiae* aussi bien que la seule cycline C caractérisée chez *S. pombe*, Mcs2, interviennent au niveau de la transcription, il est très plausible que Pchl, qui partage une homologie de séquence élevée avec toutes ces cyclines C, intervienne aussi au niveau de la régulation de la transcription.

Il est donc nécessaire de revoir les étapes principales de la régulation transcriptionnelle de la levure tout en y situant les différents couples CDK/cyclines. Le recours au terme de référence *S. cerevisiae*, système modèle le plus étudié, s'impose.

1) Complexe de preinitiation (PIC)



2) Complexe ouvert initiation-compétent

3) "Promotor clearance" et début de l'élongation

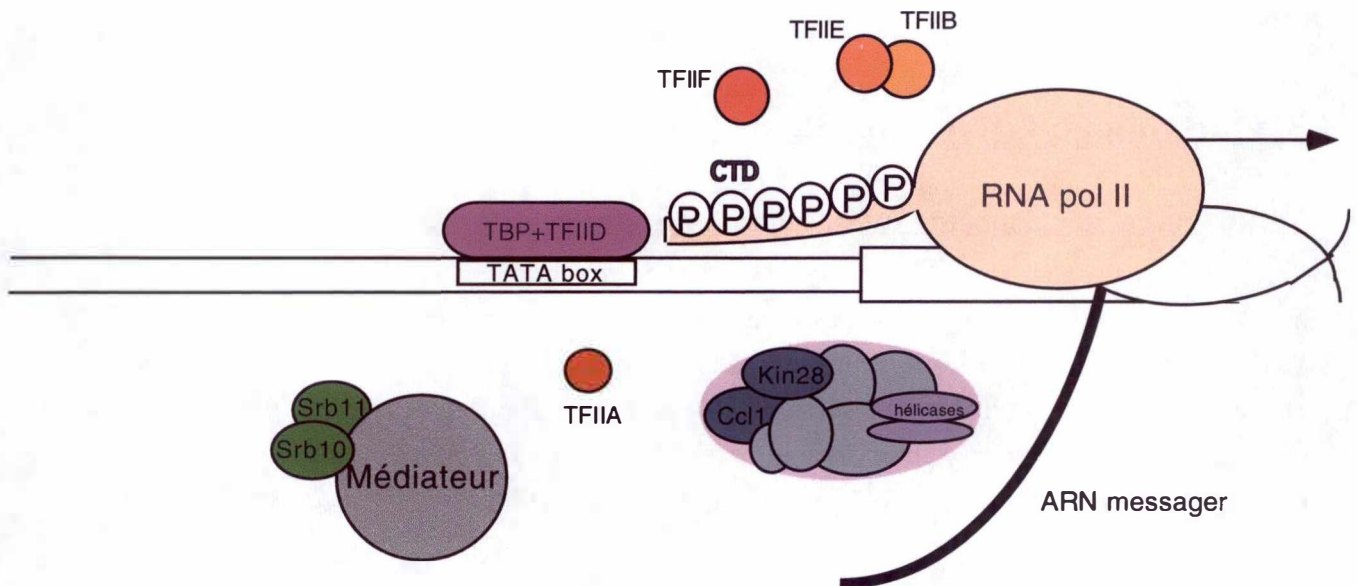


FIGURE 7: Modèle représentant les différentes étapes par lesquelles doit passer l'holoenzyme avant de pouvoir entrer en phase d'élongation (modifié d'après Svestrup *et al.*, 1996)

- 1) Avant l'initiation, l'holoenzyme se lie à la TATA-box d'un promoteur par l'intermédiaire du TFIID. Cette structure est appelée le PIC (Pre Initiation Complex).
- 2) L'initiation de la transcription commence par définition avec la formation du premier lien phosphodiester de l'ARNm. Ceci implique le dénouement de l'ADN par une hélicase. Une fois cet état atteint, l'holoenzyme ne peut plus détacher du promoteur.
- 3) Suite au "promoter clearance" qui est défini comme étant le détachement des facteurs de transcription généraux et du médiateur de l'holoenzyme, l'élongation transcriptionnelle commence. On pense actuellement que la phosphorylation du CTD est à l'origine du "promoter clearance" et que celui-ci est nécessaire pour libérer la RNA pol II qui peut alors interagir avec d'autres protéines indispensables au bon déroulement de l'élongation.

Avant d'entrer dans les détails de la régulation transcriptionnelle, il convient de rappeler, de façon globale, les différentes étapes par laquelle la RNA polymérase II et ses protéines associées doivent passer avant d'entrer en élongation (**figure 7**).

La **RNA polymérase II** la mieux caractérisée est celle de *S. cerevisiae*. Elle comprend douze polypeptides différents et a une masse totale de 0.5 megadaltons (Cramer *et al.*, 2000). Elle est capable, à elle seule, de désenrouler l'ADN, polymériser l'ARN et faire le « proofreading » des transcrits naissants. Les deux grandes sous-unités Rpb 1 et 2 forment la partie centrale à laquelle sont associées toutes les autres sous-unités (Cramer *et al.*, 2000).

La plus grande sous-unité de la RNA polymérase II contient dans sa région C-terminale un domaine appelé **CTD (C-terminal domain)** qui constitue une répétition d'un heptapeptide conservé à séquence consensus YSPTSPS, présent en 17-52 copies. Ce domaine joue un rôle particulièrement important dans la régulation transcriptionnelle. En effet, à la transition initiation/élongation de la transcription, le CTD est phosphorylé (Carlson, 1997). Alors que l'holoenzyme à CTD non-phosphorylé peut entrer en phase de pré-initiation, c'est la forme phosphorylée qui seule est capable de synthétiser l'ARN (Hengartner *et al.*, 1998). Peu est connu sur les mécanismes moléculaires induits par la phosphorylation du CTD. Actuellement, on pense que celui-ci est responsable du « promotor clearance » c.à.d. le détachement du médiateur et des facteurs de transcription généraux du promoteur ce qui permet de rendre accessible le CTD à d'autres protéines, nécessaires à l'étape d'élongation. La nécessité d'un CTD phosphorylé pour l'initiation de la transcription est promoteur-dépendant (Svejstrup *et al.*, 1996). Selon des données récentes, le CTD aurait aussi un rôle important de post-initiation dans le processing des pré-ARNm (Corden and Patturajan, 1997). Les CDK Kin28, Srb10 et Ctk1 ont une très grande affinité pour le CTD mais agissent à des niveaux différents de la régulation transcriptionnelle.

Kin28 appartient au **TFIIH** qui est un facteur de transcription général de la RNA polymérase (Drapkin and Reinberg, 1994). Celui-ci est formé d'un complexe de 7 polypeptides qui forment une structure appelée le « core » auquel est associé, chez *S. cerevisiae*, le couple Kin28/Ccl1. Parmi les protéines du « core », on trouve entre autres un facteur reliant le « core » au couple Kin28/Ccl1, deux hélicases et une DNA-binding protein (Feaver *et al.*, 1997). Chaque sous-unité du TFIIH est essentielle. Le TFIIH est un facteur à multiples fonctions (Svejstrup *et al.*, 1996). Les hélicases du complexe sont responsables de la séparation des deux brins de l'ADN sans laquelle la polymérase II ne peut pas passer du stade de PIC au stade d'initiation. Le TFIIH peut aussi s'associer à une série de protéines de réparation et intervient ainsi dans la NER (« nucleotide excision repair »). Enfin, le complexe **Kin28/Ccl1** est responsable de la phosphorylation du CTD (Cismowski *et al.*, 1995; Valay *et al.*, 1995).

Srb10 (Suppresseur of RNA polymerase B) qui a aussi une grande affinité pour le CTD (Kuchin *et al.*, 1995) appartient à un complexe **médiateur** dont les « rôles » sont résumés ci-dessous.

Dans le cadre de l'étude de la régulation transcriptionnelle, on a utilisé des complexes hautement purifiés de RNAPol II associée à ses facteurs de transcription basaux. On a constaté que dans un système contenant ces complexes purifiés, la transcription basale d'un promoteur minimal possédant une TATA-box et un site de début de transcription est possible. Or, l'ajout d'activateurs ou de répresseurs à ce système n'a aucun effet. Ceci signifie qu'il existe des protéines supplémentaires, manquant dans ce système, et qui représentent la pièce intermédiaire entre le complexe RNA polymérase II/facteurs de transcription et les facteurs de régulation (Kim *et al.*, 1994). Comme des contacts directs entre les activateurs/répresseurs et les facteurs généraux de la transcription ont lieu *in vivo*, ces interactions furent d'abord considérées comme étant suffisantes pour réguler la transcription (Roberts *et al.*, 1993). Suite aux améliorations des techniques de purification, et à l'obtention de protéines très pures, cette hypothèse s'est avérée fautive. La purification d'un complexe multiprotéique, le médiateur (Kim *et al.*, 1994), a contribué à la compréhension de la complexité de la régulation transcriptionnelle. Le médiateur, qui rassemble une vingtaine de polypeptides chez *S. cerevisiae*, se trouve associé au CTD de la polymérase. La RNA polymérase associée aux facteurs de transcription généraux et au médiateur représente la RNA polymérase holoenzyme. Vu que les activateurs et répresseurs sont capables d'interagir avec ce complexe d'holoenzyme pour réguler la transcription, le médiateur représente le joint manquant, encore appelé cofacteur, entre le facteur régulateur principal, qui est localisé dans la partie amont du promoteur et la core polymérase. Le médiateur ne rend pas seulement possible la régulation de la transcription, mais augmente aussi le taux de la transcription basale et la phosphorylation du CTD.

Les gènes *SRB10* et *SRB11* codent respectivement pour une CDK et pour une cycline. Srb10 possède le motif (S(M/Q)SACRE) au lieu du motif PSTAIRE, caractéristique partagée par toutes les CDK interagissant avec une cycline C. Un autre trait particulier que présentent Srb10 et Cdk8 est l'absence d'un résidu Thr dans le « T-loop », résidu qui, chez les autres CDK, doit être phosphorylé pour assurer leur activité maximale (Leclerc and Leopold, 1996). A la place de la Thr, on trouve un résidu D qui pourrait ainsi substituer de manière constitutive le phosphate de la Thréonine phosphorylée. Srb10 n'est donc pas régulé par phosphorylation du « T-loop ». Notons qu'on retrouve la même situation pour la protéine Cdk8 humaine, qui est la protéine qui présente le plus d'homologie de séquence (43% d'identité) avec Srb10 (Leclerc and Leopold, 1996).

Des souches qui contiennent une ARN polymérase à CTD tronqué, présentent un phénotype « Cs » (cold sensitive) et sont incapables de pousser à basse température (Carlson, 1997). Des mutations qui éliminent la fonction de Srb10 et Srb11 restaurent la viabilité dans une telle souche à basse température. Ceci suggère que Srb10 est un régulateur négatif de la transcription (Hengartner *et al.*, 1998; Kuchin *et al.*, 1995). Alors que Srb10 est indispensable

à la répression de quelques gènes fortement réprimés comme *SPO13*, *GAL1* et *SUC2*, elle n'a aucun effet sur la plupart des autres gènes. Il doit donc exister un mécanisme d'activation de Srb10 qui est spécifique des gènes qui sont sous le contrôle de cette CDK (Hengartner *et al.*, 1998). Bien que les mécanismes moléculaires qui activent Srb10 ne sont pas encore connus, l'étude de l'activité du répresseur Sfl1 sur le gène *SUC2* a montré que c'est par l'intermédiaire d'une interaction entre le complexe Srb10/Srb11 et le répresseur Sfl1 que le gène *SUC2* est réprimé (Song and Carlson, 1998).

Srb10 et Kin28 qui représentent deux CDKs distinctes appartenant à l'holoenzyme de *S. cerevisiae*, peuvent toutes les deux phosphoryler le CTD *in vitro* avec une spécificité de substrat similaire (Hengartner *et al.*, 1998). Cependant, la grande différence entre ces deux CDKs réside dans le fait qu'elles phosphorylent le CTD à des étapes différentes de la transcription: Srb10 ne peut plus phosphoryler le CTD après formation du PIC, alors que Kin28 ne devient actif qu'après ce stade. Comme Srb10 est un régulateur négatif et Kin28 un régulateur positif de la transcription, ceci suggère qu'un même événement de phosphorylation spécifique mis en œuvre à des moments différents, va entraîner des effets de régulation opposés (Hengartner *et al.*, 1998). Les mécanismes moléculaires expliquant comment le CTD hyperphosphorylé peut avoir des effets opposés suivant le moment où a lieu sa phosphorylation ne sont pas encore connus.

La kinase Ctk1, qui est la troisième CDK de *S. cerevisiae* qui hyperphosphoryle de manière très spécifique et efficace le CTD, appartient au complexe CTDK-1 (Lee and Greenleaf, 1991; Patturajan *et al.*, 1999; Sterner *et al.*, 1995). En plus de Ctk1, ce complexe contient 2 autres protéines qui sont Ctk2 et Ctk3. La protéine Ctk2 est une cycline C (Sterner *et al.*, 1995). La comparaison de la séquence de Ctk3 avec la base de données des séquences connues n'a pas permis de conférer une fonction à cette protéine (Sterner *et al.*, 1995). Les mutations nulles de chacune de ces 3 protéines produisent des phénotypes très semblables : les cellules sont viables mais se divisent moins vite que la souche sauvage. Ceci suggère que les 3 protéines interviennent dans un même processus biologique et que Ctk3 est nécessaire au bon fonctionnement du complexe CDK/cycline C.

Bien qu'il existe des similarités entre les phénotypes mutants $\Delta SRB10$ et $\Delta CTK1$ et que Srb10 et Ctk1 aient toutes les 2 une très forte spécificité de substrat pour le CTD, ces 2 kinases ne sont pas interchangeables (Kuchin and Carlson, 1998). En plus, des expériences récentes utilisant des anticorps anti-Ctk ont montré que Ctk1 et 3 ne sont pas détectables dans l'holoenzyme purifié de levure.

Des travaux récents suggèrent que CTDK-1 stimule l'efficacité d'élongation de la RNA polymérase II (Lee and Greenleaf, 1997).

3.2. Pertinence de l'étude de la régulation transcriptionnelle chez *S. pombe*

Bien qu'appartenant au groupe des Ascomycètes, les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* présentent de nettes différences dans la mise en œuvre de certaines fonctions cellulaires. Quand un événement biologique est contrôlé de la même manière chez les deux levures par l'intervention de protéines homologues chez les deux espèces, on peut probablement faire l'inférence qu'il s'agit d'un événement général que l'on retrouvera probablement chez d'autres eucaryotes.

Au contraire, l'analyse des différences existant entre des organismes apparentés conduira à des hypothèses souvent intéressantes.

La présence dans un système de contrôle biologique donné, d'un facteur singulier n'ayant pas son homologue chez l'organisme apparent permet non seulement d'enrichir la compréhension du système, mais pourra aussi, le cas échéant, permettre d'établir des connexions insoupçonnées entre le système à l'étude et d'autres où un rôle pléiotrope de ce facteur serait mis en évidence. C'est donc une pratique courante et féconde de chercher à comparer des situations dans des organismes qui ne sont pas phylogénétiquement, ni trop proches, ni trop éloignées.

3.3. Caractérisation des protéines intervenant dans la régulation transcriptionnelle de *S. pombe*

Alors que chez *S. cerevisiae*, on connaît toute une série de protéines qui interviennent dans la régulation de la transcription, on sait très peu de choses sur la régulation transcriptionnelle chez *S. pombe* et notamment sur les rôles qu'y jouent les homologues de Ctk1 et Srb10. Le seul complexe CDK/cycline C caractérisé chez *S. pombe* est le couple Mcs6/Mcs2 dont l'homologue chez *S. cerevisiae* est Kin28/Ccl1 (Buck *et al.*, 1995; Damagnez *et al.*, 1995).

Le couple Mcs6/Mcs2 montre le plus de similarités de séquence avec les complexes Kin28/Ccl1 de *S. cerevisiae* et CDK7/cycline H humain. Contrairement à Kin28/Ccl1, le couple Mcs6/Mcs2 (comme le couple Cdk7/cyclineH) présente une double spécificité de substrats *in vitro*. Il phosphoryle aussi bien une série de CDK sur leur loop d'activation que le CTD (Buck *et al.*, 1995; Cismowski *et al.*, 1995; Damagnez *et al.*, 1995; Valay *et al.*, 1995). De plus, CDK7 peut « sauver » une souche disruptée $\Delta mcs6$, ce qui témoigne d'une homologie fonctionnelle entre les deux kinases (Buck *et al.*, 1995). Des données récentes suggèrent que le couple Mcs6/Mcs2 ait un rôle dual de CAK (CDK-activating kinase) et de CTD-kinase *in vivo* chez *S. pombe*. Mcs6-Mcs2 interviendrait donc à la fois dans le contrôle du cycle cellulaire (fonction CAK) et de la transcription par l'ARN polymérase II (fonction CTD-kinase). La levure bourgeonnante est la seule espèce connue, où deux kinases distinctes jouent les rôles de CTD kinase et de CAK (Kaldis *et al.*, 1996).

Chez *S. pombe*, un complexe multiprotéique médiateur a été décrit (Spahr *et al.*, 2000). Il contient quatre sous-unités représentant des homologues de polypeptides du médiateur de *S. cerevisiae*. Avec une masse de 400 kDa, ce médiateur de *S. pombe* présente une taille beaucoup plus petite que celui de *S. cerevisiae* et des mammifères (1000 kDa). Il contient six sous-unités non caractérisées auparavant. Il est très probable que les sous-unités conservées chez les deux espèces interagissent avec la polymérase II, qui ont tous deux des structures très conservées entre les deux levures, alors que les sous-unités non conservées sont responsables des interactions plus spécifiques avec les activateurs et répresseurs.

BUT DU TRAVAIL

Les données présentées dans l'introduction qui précède nous permettent de conclure que Pch1 interagit :

- soit avec une protéine homologue des CDKs de *S. cerevisiae*.
- soit avec Mcs6, CDK de *S. pombe*.
- soit avec un partenaire encore non caractérisé de *S. pombe* qui n'a pas d'homologue chez *S. cerevisiae*.

Il existe des arguments pour et contre l'interaction entre Pch1 et l'homologue de chacune des trois CDKs dépendantes de cycline C de *S. cerevisiae*.

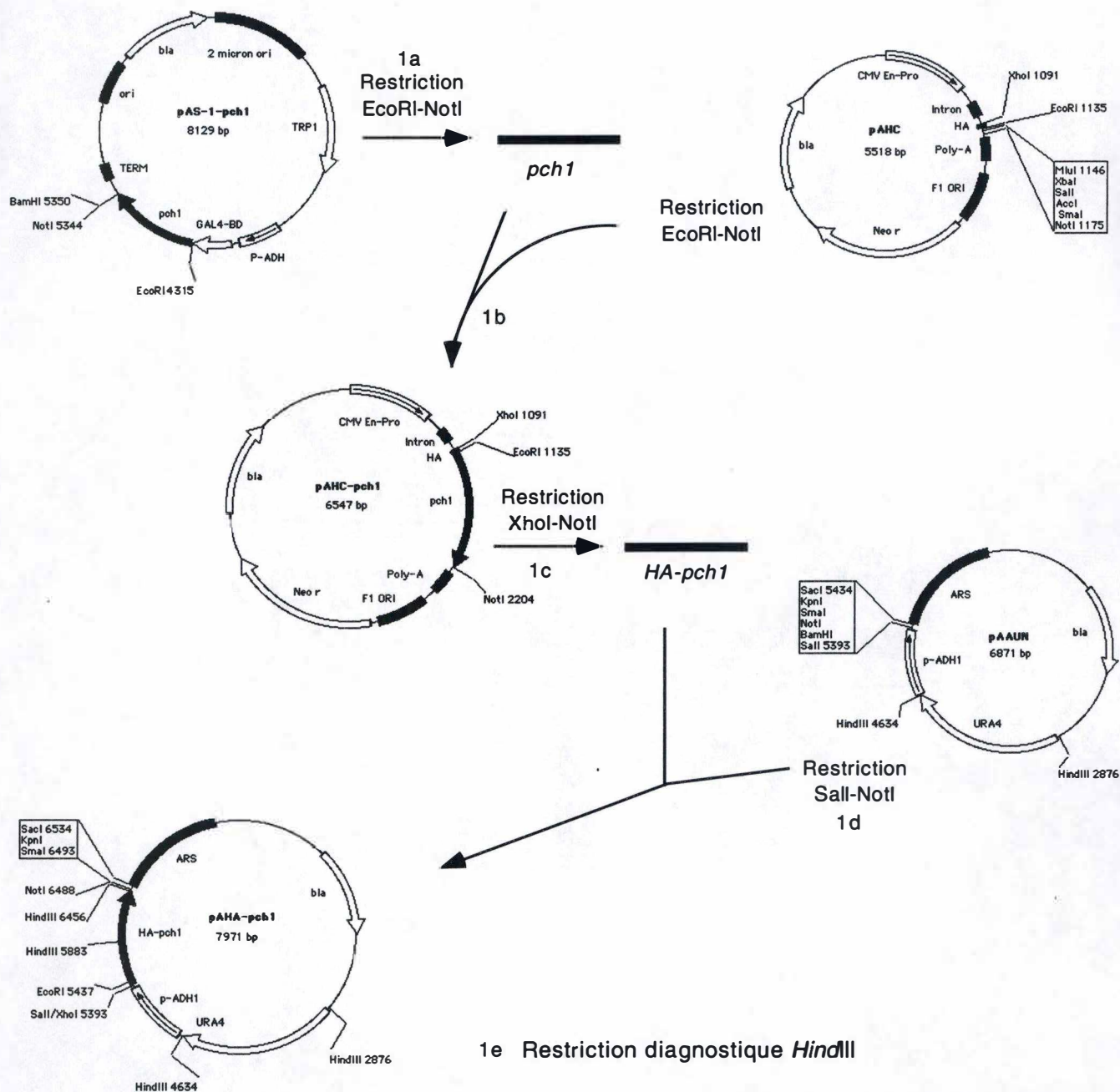
	Données en faveur d'une interaction avec Pch1	Données en défaveur d'une interaction avec Pch1
Mcs6, homologue Kin 28	<ul style="list-style-type: none"> • Ccl1, partenaire de Kin28, présente 26% d'identité de séquence de la cycline box avec Pch1 	<ul style="list-style-type: none"> • Mcs6 interagit avec une autre cycline de <i>S. pombe</i>, Mcs2
Prk1, homologue Srb10	<ul style="list-style-type: none"> • Srb11, partenaire de Srb10, présente 36% d'identité de séquence de la cycline box avec Pch1 	<ul style="list-style-type: none"> • Srb10 est une protéine non-essentielle • <i>prk1</i> est non-essentiel
SPAC2F3.15 homologue Ctk1	<ul style="list-style-type: none"> • Ctk2, partenaire de Ctk1, présente 22% d'identité de séquence de la cycline box avec Pch1 	<ul style="list-style-type: none"> • Ctk1 est une protéine non-essentielle • Il existe un homologue putatif de Ctk2 chez <i>S. pombe</i> (SPBC530.13)

Vu que Mcs6 est la seule CDK essentielle à motif « SACRE » connue actuellement chez *S. pombe*, il est possible que cette dernière interagisse avec Pch1. On peut donc envisager la possibilité que Mcs2 et Pch1 interagissent toutes les deux avec Mcs6, mais pour remplir des fonctions différentes puisque ces deux cyclines sont essentielles.

L'objectif de ce travail est de caractériser le partenaire kinase associé avec Pch1 chez *S. pombe*. Dans un premier temps nous testerons l'hypothèse que cette kinase soit Mcs6 en tentant de co-précipiter Mcs6 et Pch1 à partir d'extraits protéiques de *S. pombe*.

Si il s'avère que Mcs6 ne co-précipite pas avec Pch1, nous entamerons un crible double-hybride utilisant Gal4-Pch1 comme appât contre une banque d'ADNc de *S. pombe* dans le but d'isoler des partenaires de la cycline Pch1.

RESULTATS



enzyme	site de restriction	longueur des fragments
HindIII	A'AGCTT	4391 pb, 1758 pb, 1249 pb, 573 pb



Figure 1 : Schéma représentant les différentes étapes de la construction du plasmide pAHA-pch1.

1a. Le plasmide pAS1-pch1 est restreint en *EcoRI/NotI* pour sortir l'insert *pch1*.

1b. L'insert *pch1* est cloné en fusion au tag HA dans le plasmide pAHC restreint en *EcoRI/NotI*.

1c. Le vecteur pAHC-pch1 est restreint en *XhoI/NotI*, libérant la fusion HA-pch1.

1d. Le plasmide pAAUN est restreint en *SalI/NotI* pour y cloner la fusion HA-pch1. Le plasmide résultant est appelé pAHA-pch1.

1e. Restriction *HindIII* sur 4 minipréparations d'ADN montrant le profil de restriction attendu pour le plasmide pAHA-pch1.

1. Etude biochimique de l'interaction putative entre la CDK Mcs6 et la cycline Pch1 et caractérisation de l'activité kinase associée à Pch1

Le phénotype terminal des spores délétées pour *pch1* et l'importante homologie de séquence qui existe entre Pch1 et une autre cycline de type C, Mcs2, supportent l'hypothèse d'une interaction de Pch1 avec la cycline dépendant kinase Mcs6.

En effet, le phénotype terminal des spores délétées pour *pch1* est réminiscent de celui observé pour les spores délétées pour *mcs2*. Ceci pourrait refléter un recouvrement des fonctions entre ces deux protéines. Cependant, comme les deux gènes sont essentiels, ces fonctions ne peuvent être complètement redondantes. Dans la première partie de ce travail, nous avons voulu éprouver l'hypothèse que Mcs6, la CDK associée à Mcs2, soit aussi le partenaire kinase de Pch1. Nous avons en même temps comparé les activités kinases associées à Pch1 et Mcs2 respectivement.

1.1. Etapes préliminaires

1.1.1. Construction du plasmide pAHA-*pch1*

Comme nous ne possédons pas d'anticorps anti-Pch1, nous avons utilisé une version de Pch1 « taggée » par l'épitope (un épitope de l'hémagglutinine du virus Influenza) en N-terminal. Afin d'exprimer cette protéine de fusion chez *S. pombe*, un vecteur d'expression, le pAHA-*pch1*, a été construit. Le vecteur pAS1-*pch1* (dont la construction est détaillée au point 3.3.1) a été restreint par les enzymes *EcoRI* et *NotI* et cloné dans le vecteur pAHC (voir matériels et méthodes) restreint en *EcoRI/NotI*. Cette ligation permet de fusionner, en gardant la phase, le gène *pch1* à la séquence codante du tag HA. Le plasmide résultant, pAHC-*pch1*, a ensuite été restreint en *XhoI/NotI* et la fusion HA-*pch1* purifiée. Cet insert a finalement été cloné dans le vecteur pAAUN (voir matériels et méthodes) restreint en *SalI/NotI* (les enzymes *SalI* et *XhoI* étant compatibles) pour donner le pAHA-*pch1*. La construction de ce vecteur a été résumée à la **figure 1**.

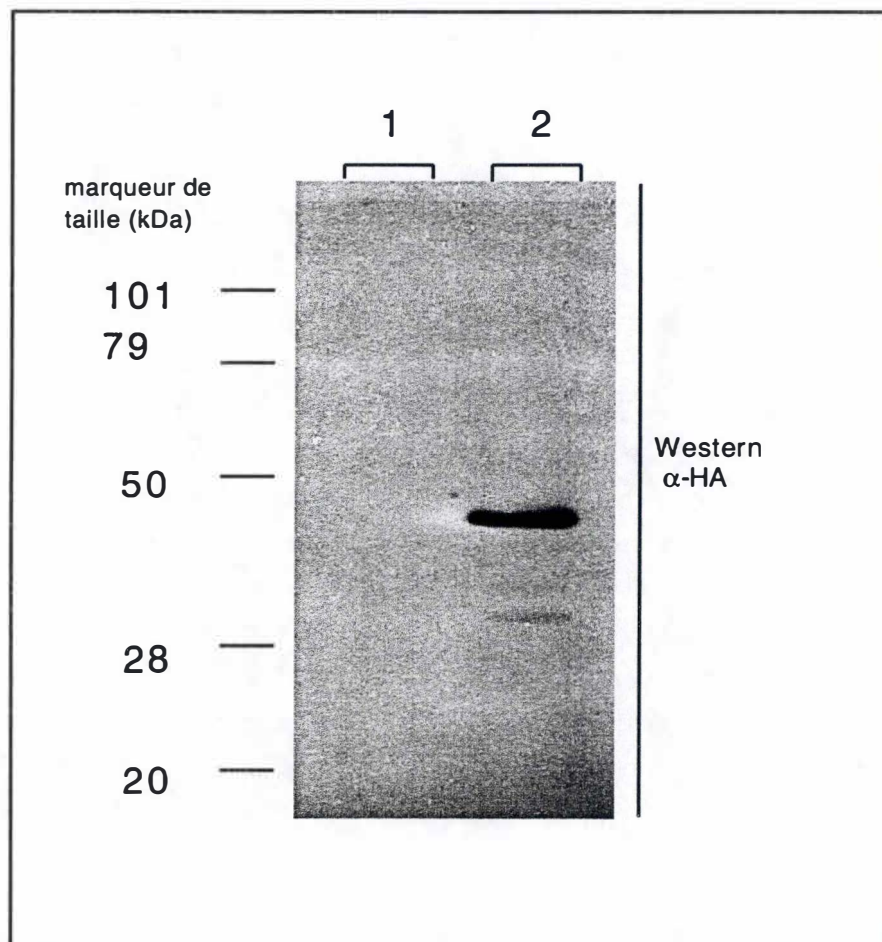
La construction a été vérifiée par restriction diagnostique *Hind III*. Le profil de restriction attendu contient 4 bandes correspondant aux tailles de 4391, 1758, 1249 et 573 pb, ce qu'on peut observer dans la **figure 1d**. HA-*pch1* a donc bien été cloné dans le vecteur d'expression pAAUN.

Le plasmide pAHA-*pch1* a été transformé ensuite dans la souche 96116 de *S. pombe*.

Pour vérifier si la protéine de fusion HA-Pch1 est exprimée *in vivo*, nous avons réalisé un Western Blot avec des anticorps α -HA sur des lysats cellulaires de la souche 96116 transformée avec le plasmide pAHA-*pch1* (piste 2) ou avec le plasmide vide (piste 1) comme

Figure 2: Autoradiographie d'un Western blot α -HA montrant que la protéine de fusion HA-Pch1 est exprimé dans une souche transformée avec le plasmide pAHA-*pch1*

Des lysats cellulaires (40 μ g de protéines) extraits de la souche 96116 transformée avec le plasmide pAAUN (piste1) ou le plasmide pAHA-*pch1* (piste 2) ont été séparés sur gel de polyacrilamide 12%. Après transfert sur une membrane de nitrocellulose et hybridation avec des anticorps α -HA, le blot est révélé selon le protocole ECL (voir matériel et méthodes).



contrôle négatif. Une bande correspondant à la taille attendue de la protéine de fusion (38 kD) est visible sur le film autoradiographique (**figure 2**) alors qu'aucune bande n'est apparue sur la piste du contrôle négatif. La protéine de fusion est donc bien exprim  e dans la souche 96116. Une exposition plus longue a r  v  l  e la présence de bandes de plus petite taille dans la piste 2. Elles pourraient correspondre à des formes d  grad  es ou modifi  es (phosphorylation, glycosylation...) de la protéine HA-Pch1.

1.1.2. Transformation des plasmides de contrôle positif et négatif

En vue d'étudier l'interaction entre Pch1 et Mcs6 par Co-IP, une série de souches a été créée. Le tableau suivant résume les différents contrôles que nous avons utilisés.

Souche transform��e	plasmides	Protéines exprim��es	But
96116	PAAUN + pREP- <i>myc-mcs6</i>	Myc-Mcs6	Contrôle négatif
96116	pAHA- <i>pch1</i> + pREP	HA-Pch1	Contrôle négatif
96116	pAHA- <i>mcs2</i> + pREP	HA-Mcs2	Contrôle négatif
96116	pAHA- <i>pch1</i> + pREP- <i>myc-mcs6</i>	HA-Pch1 + Myc-Mcs6	TEST
GP33	pAHA- <i>mcs2</i> + pREP- <i>myc-mcs6</i>	HA-Mcs2 + Myc-Mcs6	Contrôle positif d'interaction

1.1.2.1. Vérification de l'expression des protéines de fusion HA-

Pour vérifier que les protéines fusionn  es au tag HA cod  es par ces plasmides sont bien exprim  es dans les souches 96116 et GP33, nous avons réalisé un Western blot α -HA sur des extraits protéiques provenant des souche 96116 et GP33 transform  es avec les différents plasmides mentionnés dans le tableau ci-dessus (**figure 3**).

Comme prévu, aucune bande n'apparaît sur la piste 1, comme le plasmide pAAUN est vide. Les bandes prévues correspondant aux tailles des protéines de fusion HA-Pch1 (38 kDa) ou HA-Mcs2 (35 kDa) sont visibles sur les pistes 2,3 et 4 et Mcs2 apparaît comme un doublet comme décrit précédemment (Damagnez *et al.*, 1995). Cependant dans la piste 5 correspondant aux extraits protéiques de la souche GP33 transform  e avec les plasmides pAHA-*mcs2* et pREP-*myc-mcs6*, la protéine HA-Mcs2 n'est pas visible. Cependant, une exposition beaucoup plus longue permet de voir une fine bande correspondant à HA-Mcs2.

Il semble donc qu'en présence d'une surexpression de Myc-Mcs6, la concentration de la protéine HA-Mcs2 surexprim  e chute dramatiquement. Il est possible que la cellule ne tolère pas la surexpression concomitante de Myc-Mcs6 et HA-Mcs2 et dégrade une grande partie du pool de HA-Mcs2 présent. Bien qu'aucune autre donn  e expérimentale ne supporte cette

Figure 3: Autoradiographie d'un Western blot α -HA. Test d'expression des différentes protéines de fusion HA-

Des lysats cellulaires (40 μ g) extraits des souches 96116 ou GP33 transformées avec les combinaisons de plasmides indiquées, ont été analysés selon la même procédure que décrite à la figure 2.

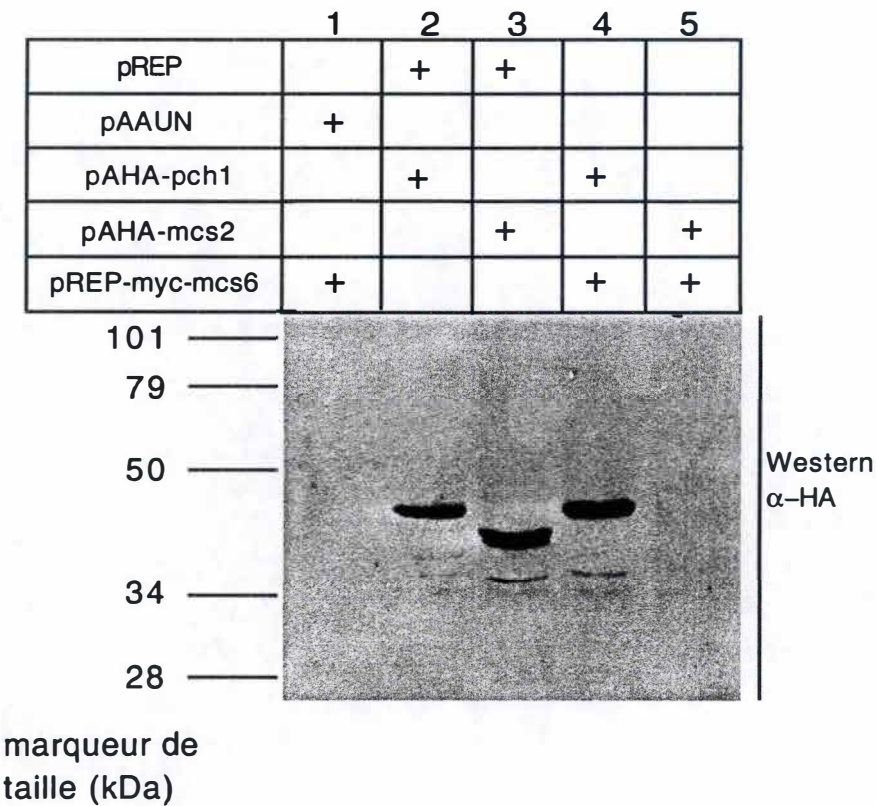


Figure 4: Autoradiographie d'un Western blot α -myc. Test de l'expression des différentes protéines de fusion myc.

Des lysats cellulaires (40 μ g) des souches 96116 et GP33 transformées avec les combinaisons de plasmides indiquées ont été analysés selon la même procédure que décrite à la figure 2.

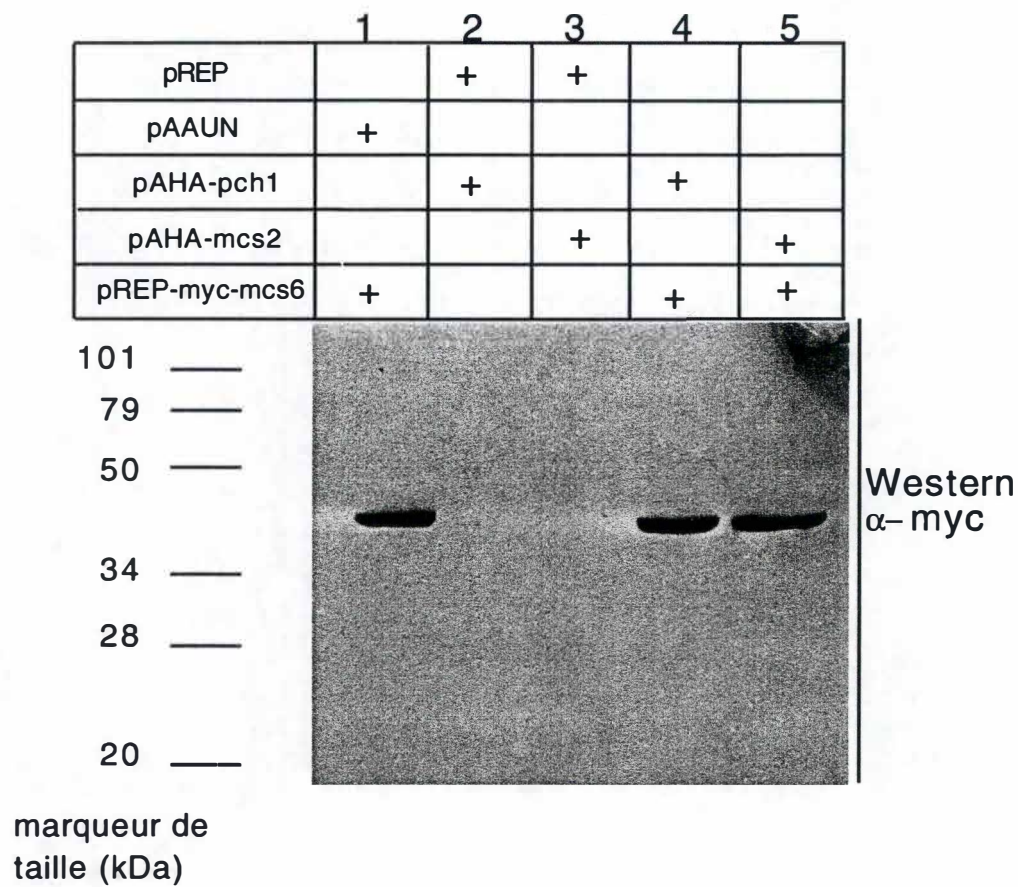
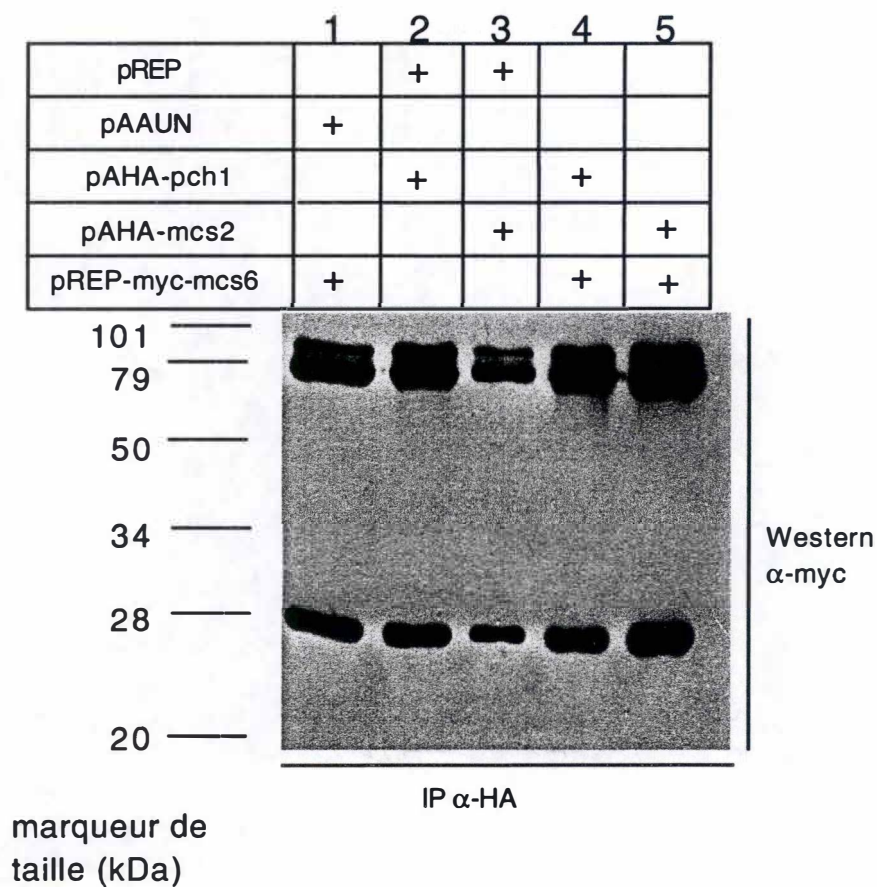


Figure 5: Film photographique d'un Western blot anti-myc réalisé sur le produit de la Co-IP α -HA.

Des billes de protéineA-sépharose ont été incubées avec des lysats cellulaires (700 μ g) provenant de levures transformées avec les combinaisons de plasmides indiquées. Suite à l'ajout à ces échantillons d'anticorps α -HA, pouvant se lier à la protéineA, les complexes immuns contenant les anticorps α -HA et les protéines taggées à HA, vont précipiter. Les partenaires de HA-Pch1 et HA-Mcs2 vont co-précipiter dans ces complexes. Ces échantillons ont été séparés sur gel de polyacrylamide. Après transfert sur une membrane de nitrocellulose et hybridation avec des anticorps α -Myc, le blot est révélé selon le protocole ECL.



hypothèse, le même effet est observé quand Csk1, la kinase activatrice de Mcs6/Mcs2 est surexprimée chez *S. pombe* (Hermant *et al.*, 1998).

1.1.2.2. Vérification de l'expression de la protéines de fusion Myc-Mcs6

Pour vérifier l'expression de la kinase Mcs6 « taggée » avec Myc dans les souches transformées avec les différents plasmides, nous avons réalisé un Western Blot α -Myc (**figure 4**). Des bandes correspondant à la taille de la protéine de fusion Myc-Mcs6 (39,7 kDa) sont bien visibles sur les pistes 1, 4 et 5. Ce résultat indique que la protéine de fusion Myc-Mcs6 est produite quand la souche possède le plasmide pREP-*myc-mcs6*.

Ce Western nous fournit une information supplémentaire: la surexpression dans une même cellule des protéines HA-Mcs2 et Myc-Mcs6 n'affecte pas la surexpression de Myc-Mcs6, bien que la concentration de HA-Mcs2 soit dramatiquement réduite.

Ces expériences de Western Blot confirment l'expression correcte des protéines taggées dans nos différents contrôles à l'exception du contrôle positif d'interaction.

1.2. Etude de l'interaction putative de Mcs6 et Pch1 par Co-immunoprécipitation

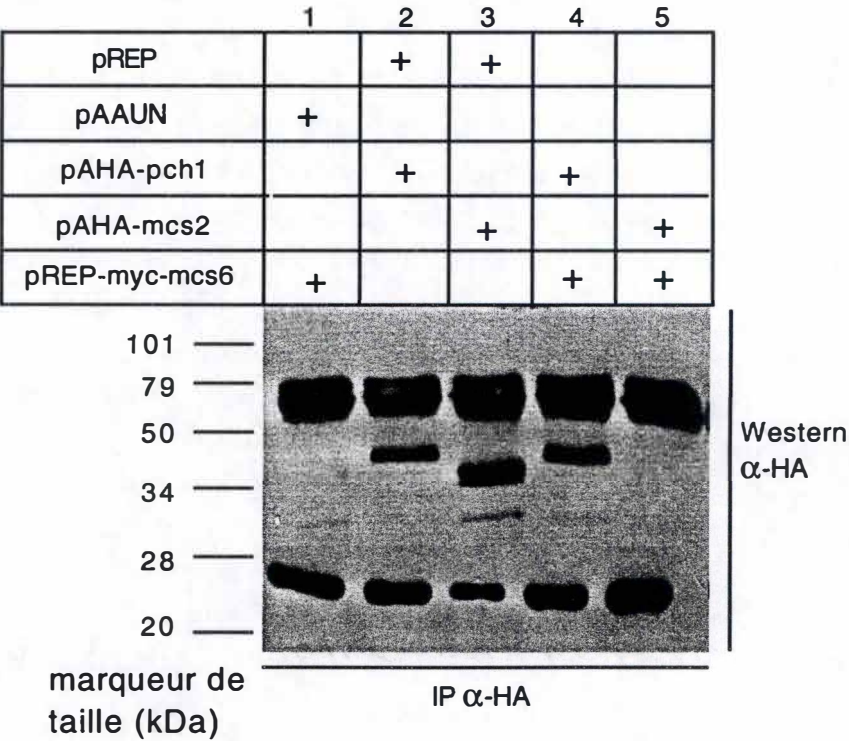
Dans le but de tester l'interaction entre Pch1 et Mcs6, une série de co-immunoprécipitations ont été réalisées sur des billes de protéineA-Sépharose avec des anticorps α -HA qui forment des complexes immuns avec les protéines HA-Mcs2 ou HA-Pch1 et leurs partenaires respectifs. Les extractions protéiques réalisées sur les souches décrites aux points précédents ont été dosées et la précipitation avec des anticorps α -HA a été réalisé sur 700 μ g de chaque extrait protéique. Après 4 lavages, du tampon de chargement est ajouté sur les billes de sépharose et le précipitat est chargé sur un gel de polyacrylamide 12%. Un Western blot est ensuite réalisé avec des anticorps dirigés contre l'épitope Myc, pour détecter la protéine Myc-Mcs6 éventuellement co-précipitée. Comme contrôle positif nous avons utilisé la souche transformée avec deux plasmides codant pour les protéines de fusion HA-Mcs2 et Myc-Mcs6. Comme l'interaction entre Mcs2 et Mcs6 a été démontrée *in vivo* (Buck *et al.*, 1995; Damagnez *et al.*, 1995), HA-Mcs2 devrait co-immunoprécipiter Myc-Mcs6. Cependant les résultats du Western blot de la figure 3 montrent que le niveau de HA-Mcs2 est plus bas dans cette souche. Il est donc possible que la co-précipitation ne soit pas détectable.

1.2.1. Résultats (figure 5)

- Deux bandes correspondant à des tailles d'environ 79 et 30 kDa, identiques au niveau de chacune des 5 pistes, ont été détectées sur le film autoradiographique. La première bande représente les chaînes lourdes des anticorps anti-HA alors que la deuxième, correspondant à un poids moléculaire beaucoup plus bas, représente les chaînes légères de ces mêmes anticorps. Lors de la migration sur gel protéique, ces chaînes se sont dissociées suite à l'effet dénaturant du SDS et ont migré indépendamment les unes des autres, suivant leur poids moléculaire. Comme il s'agit d'anticorps monoclonaux de souris, et comme les anticorps anti-

Figure 6: Autoradiographie d'un western blot α -HA. Vérification de la précipitation correcte des protéines taggées HA-

La membrane présente à la figure 5 a été "strippée" et hybridée avec des anticorps α -HA pour vérifier la précipitation de ces protéines



Myc sont également des monoclonaux de souris, la détection des Western met en évidence les anticorps anti-HA utilisés pour la précipitation.

- La piste correspondant à la souche transformée avec les plasmides codant pour HA-Pchl et Myc-Mcs6 ne contient pas de bandes à la taille de Myc-Mcs6. Nous ne pouvons donc pas détecter de co-immunoprécipitation de HA-Pchl et Myc-Mcs6.

- Aucune bande n'est détectable au niveau du contrôle positif. Ce résultat est en corrélation avec la très faible quantité de protéine HA-Mcs2 détectée par Western Blot (**Figure 3**). La quantité de Myc-Mcs6 qui pourra coimmunoprécipiter avec la fraction non-dégradée de HA-Mcs2 sera trop basse pour être visualisée lors du Western Blot anti-Myc.

Le contrôle positif n'étant pas valide, nous avons « strippé » la membrane pour l'exposer à des anticorps anti-HA (**figure 6**) dans le but de vérifier que la protéine HA-Pchl (pistes 2 et 4) a bien été précipitée sur les billes de sépharose par les anticorps anti-HA. Par le stripping de la membrane, tous les anticorps primaires et secondaires attachés à leurs épitopes respectifs vont se détacher alors que les protéines qui ont été transférées sur cette membrane y restent accolées. La détection des protéines de fusion -HA au niveau des pistes 2,3 et 4 (**figure 6**) montre que les fusions HA exprimées ont bien été précipitées.

Comme on le voit sur la **figure 6**, des bandes correspondant à HA-Pchl (Piste 2 & 4), et à HA-Mcs2 (Piste 3) sont visibles ce qui démontre que la précipitation a fonctionné.

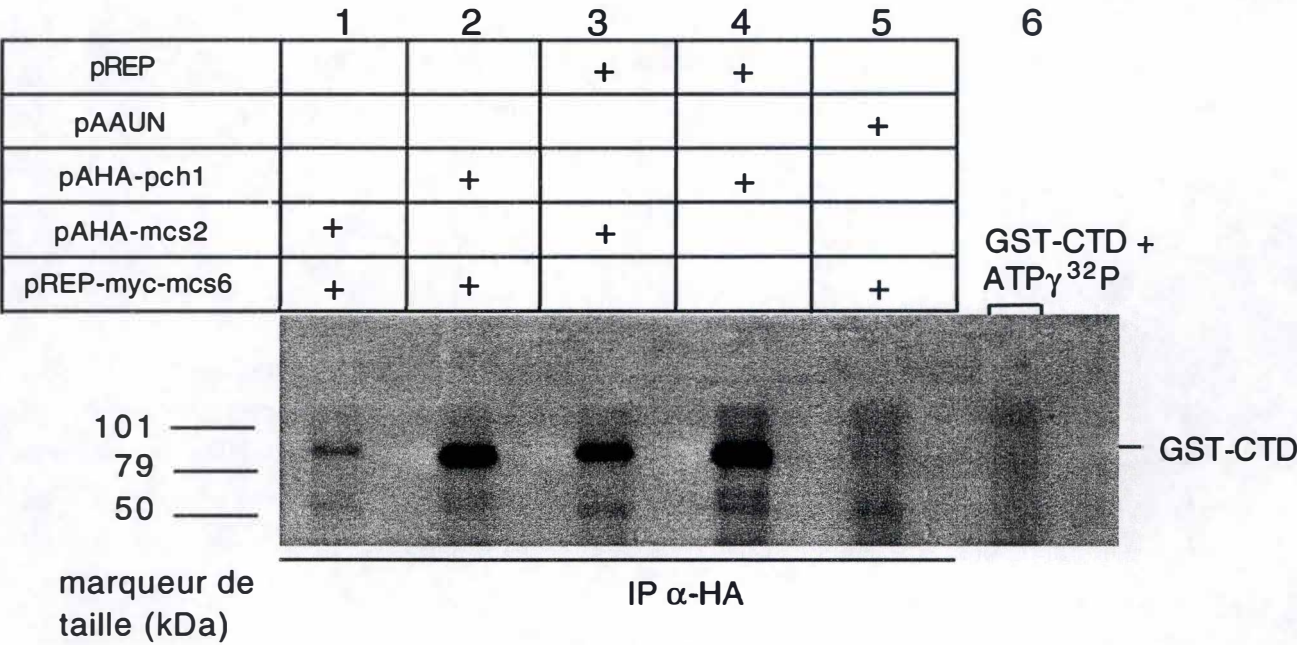
1.3.Kinase assay

Le résultat de la Co-IP semble indiquer que HA-Pchl et Myc-Mcs6 n'interagissent pas. Nous avons voulu aborder cette question sous un autre angle, en testant l'effet de la surexpression de Myc-Mcs6 sur l'activité kinase associée avec HA-Pchl. Dans le même temps, une comparaison des activités kinases associées à HA-Pchl et HA-Mcs2 a été réalisée. Une première étude de la spécificité de substrat de la kinase associée à Pchl a été réalisée en 1997 par l'équipe de Paul Russell (Furnari *et al.*, 1997). En utilisant trois substrats différents (Histone H1, CTD et Myelin Basic Protein) elle conclut qu'aucun des trois substrats n'est fortement phosphorylé par le complexe contenant Pchl.

Afin de vérifier l'activité kinase associée à HA-Pchl, nous avons procédé à une immunoprécipitation suivie d'un « kinase assay » en utilisant comme substrat une fusion GST-CTD. Des extraits protéiques ont été préparés à partir des souches présentées plus haut (voir 1.1.2). Une immuno-précipitation avec des anticorps α -HA suivie d'une réaction kinase (matériel et méthode) ont ensuite été réalisées.

Figure 7: Autoradiographie d'un gel SDS-page. Test d'activité kinase

Des billes de protéineA-sépharose ont été incubées avec des anticorps α -HA et des lysats cellulaires à partir de cellules transformées avec les combinaisons de plasmides indiquées. Une réaction kinase a ensuite été réalisée en présence de kinase buffer, ATP γ - 32 P et GST-CTD. Comme contrôle négatif, nous avons utilisé un échantillon de kinase buffer contenant de l'ATP γ - 32 P et GST-CTD. Après SDS-page, le gel a été exposé pendant une nuit sur un film autoradiographique.



1.3.1. Résultats (Figure 7)

Pistes 1 et 3

- Une bande très faible, correspondant au GST-CTD phosphorylé, est détectable quand HA-Mcs2 et Myc-Mcs6 sont surexprimés simultanément dans la cellule.
- Quand HA-Mcs2 est surexprimé seul, cette bande est plus intense.

Pistes 2 et 4

- Une bande de forte intensité apparaît aussi bien quand HA-Pch1 est surexprimé seul que quand HA-Pch1 et Myc-Mcs6 sont surexprimés tous les deux.

Pistes 5 et 6

Les pistes 5 et 6 correspondent aux 2 contrôles négatifs.

- Piste 5 : aucune bande n'est détectable.
- Piste 6 : l'échantillon de kinase buffer seul (GST-CTD, γ -³²P ATP) chargé sur cette piste ne donne pas naissance à une bande radioactive.

1.3.2. Interprétation

Comme les résultats du Western α -HA suggèrent qu'une grande partie de la protéine de fusion HA-Mcs2 est dégradée par la cellule quand elle est surexprimée en même temps que Myc-Mcs6, il n'est pas surprenant que la bande correspondant au CTD phosphorylé par le complexe HA-Mcs2/Myc-Mcs6, immunoprécipité par des anticorps anti-HA, soit d'intensité très faible. En effet, comme seulement une petite fraction des protéines HA-Mcs2 va échapper à la dégradation dans ces cellules, beaucoup moins de Myc-Mcs6 pourra coimmunoprécipiter que dans le cas normal pour phosphoryler le CTD par la suite. Ceci explique la faible intensité de la bande observée au niveau de la piste 1.

Comme le montre la piste 3, une bande plus intense est visible quand HA-Mcs2 est exprimé seul. Dans ce cas, HA-Mcs2 coprécipite la protéine endogène Mcs6.

Ce qui est intéressant dans cette expérience, c'est qu'on peut directement comparer l'activité kinase précipitée par HA-Pch1 avec celle précipitée par HA-Mcs2 en analysant l'intensité de leurs bandes respectives. Cette comparaison est possible vu que la même quantité de protéines a été chargée dans les différents puits et que le même anticorps a été utilisé pour la précipitation des différents complexes. Par ailleurs, le Western blot anti-HA, réalisé avec les mêmes anticorps que le kinase assay, montre des bandes de même intensité pour HA-Pch1 et pour HA-Mcs2, ce qui confirme que le « kinase assay » a bien été normalisé.

Nous observons que l'activité kinase précipitée par HA-Pch1 est au moins aussi intense que celle précipitée par HA-Mcs2 quand GST-CTD est utilisé comme substrat. Ce résultat contraste avec les données publiées (Furnari *et al.*, 1997) qui concluaient que le CTD n'était pas un bon substrat pour la kinase associée à Pch1.

La comparaison des bandes 2 et 4 nous fournit une information supplémentaire : les bandes au niveau de ces deux pistes étant identiques, nous pouvons en conclure que la surexpression de Myc-Mcs6 n'influence pas l'activité kinase précipitée avec HA-Pchl.

1.4. Conclusion générale

Le fait que HA-Pchl ne coimmunoprécipite pas Myc-Mcs6 et que la surexpression de Myc-Mcs6 n'ait aucun effet sur l'activité kinase associée à HA-Pchl suggère que Mcs6 n'est pas le partenaire principal de Pchl.

Au vue de ces résultats, nous avons décidé de réaliser un crible double hybride pour isoler des protéines interagissant avec Pchl, espérant y trouver la kinase qu'elle régule.

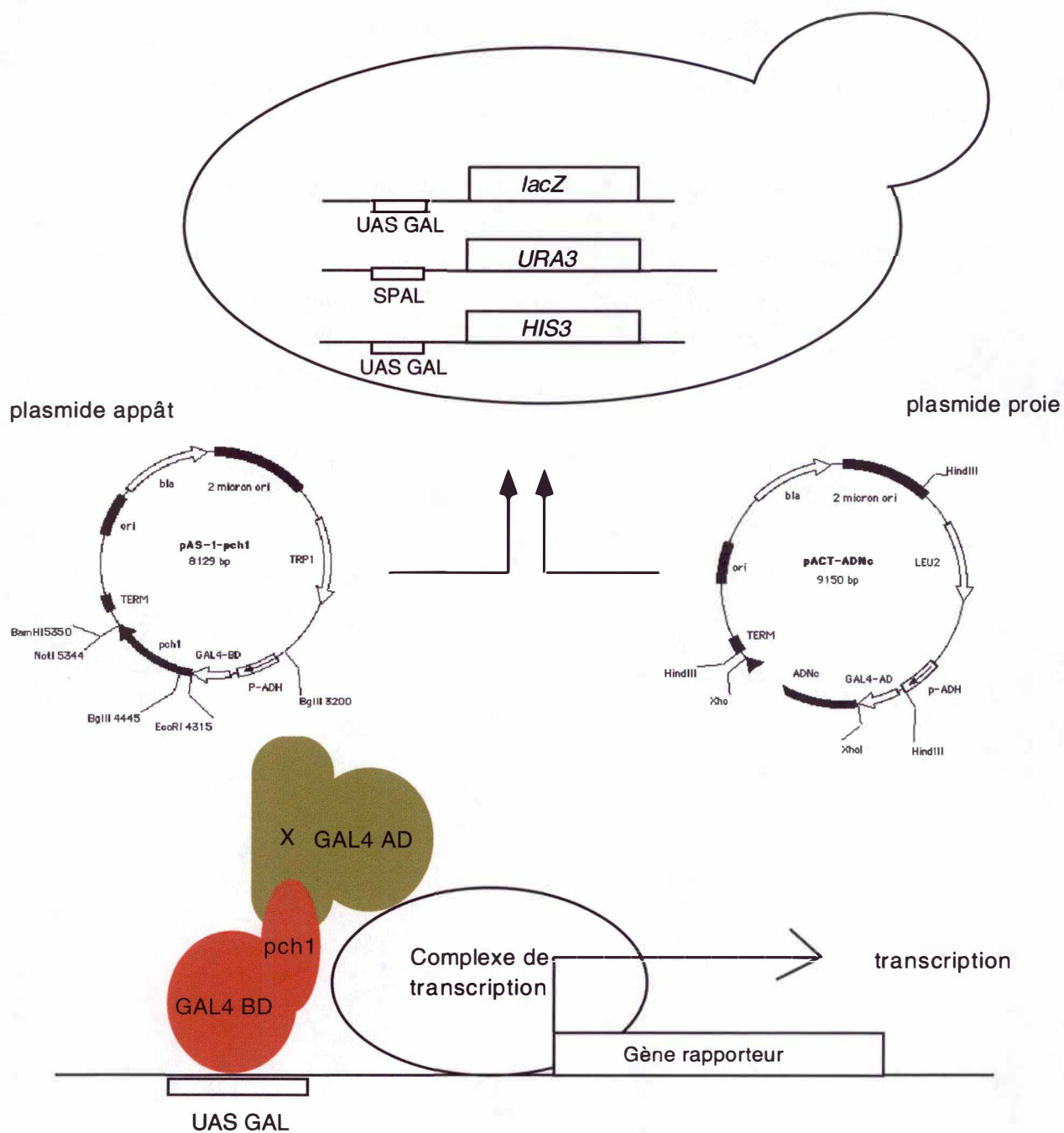


Figure 8: Schéma représentant le principe du crible double-hybride utilisant le système GAL4

La souche de *S. cerevisiae* possède des séquences promotrices UAS GAL1 en amont des gènes *HIS3* et *lacZ*, et une séquence promotrice SPAL en amont du gène rapporteur *URA3*. Cette souche est transformée avec deux plasmides: le plasmide appât qui code pour la protéine de fusion Gal4 BD-Pch1 et le plasmide proie qui code pour une protéine Gal4 AD fusionnée à une séquence peptidique X codée par un insert d'ADNc de *S. pombe*.

Le gène rapporteur est activé grâce à l'interaction entre Gal4 BD-Pch1 et la protéine Gal4 AD-X permettant la "reconstitution" du facteur de transcription Gal4.

2. Recherche des partenaires de la cycline Pch1 par crible double hybride

2.1. Principe du crible double-hybride (figure 8)

Le crible double-hybride est une technique qui est utilisée pour isoler des partenaires qui interagissent avec une protéine d'intérêt.

Deux types de plasmides sont utilisés dans cette technique : le premier permet d'exprimer le gène codant pour la protéine d'intérêt, fusionné au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (Gal4-BD). Cette protéine de fusion constitue « l'appât » du système. Dans le deuxième plasmide une banque d'ADNc est exprimée en fusion avec le domaine d'activation de la transcription de Gal4 (Gal4-AD) (Fields and Song, 1989). Les protéines de fusion qui en résultent représentent les « proies » du système. Des cellules de levures, rendues compétentes pour le crible, sont transformées avec ces deux plasmides. Les protéines appât et proie sont donc coexprimées dans ces cellules qui contiennent des rapporteurs de leur interaction potentielle. Les rapporteurs sont des gènes qui au niveau de leur promoteur possèdent un ou plusieurs sites de liaison pour le GAL4-BD.

L'interaction entre l'appât et la proie permet de reconstituer un facteur de transcription Gal4 fonctionnel, ce qui va entraîner la transcription des gènes rapporteurs. Comme la souche de levure utilisée pour le crible est disruptée pour *GAL4*, seule l'interaction entre proie et appât permet de « reconstituer » un facteur de transcription Gal4 actif, en "rapprochant" suffisamment les deux domaines de Gal4.

2.2. Les trois gènes rapporteurs utilisés

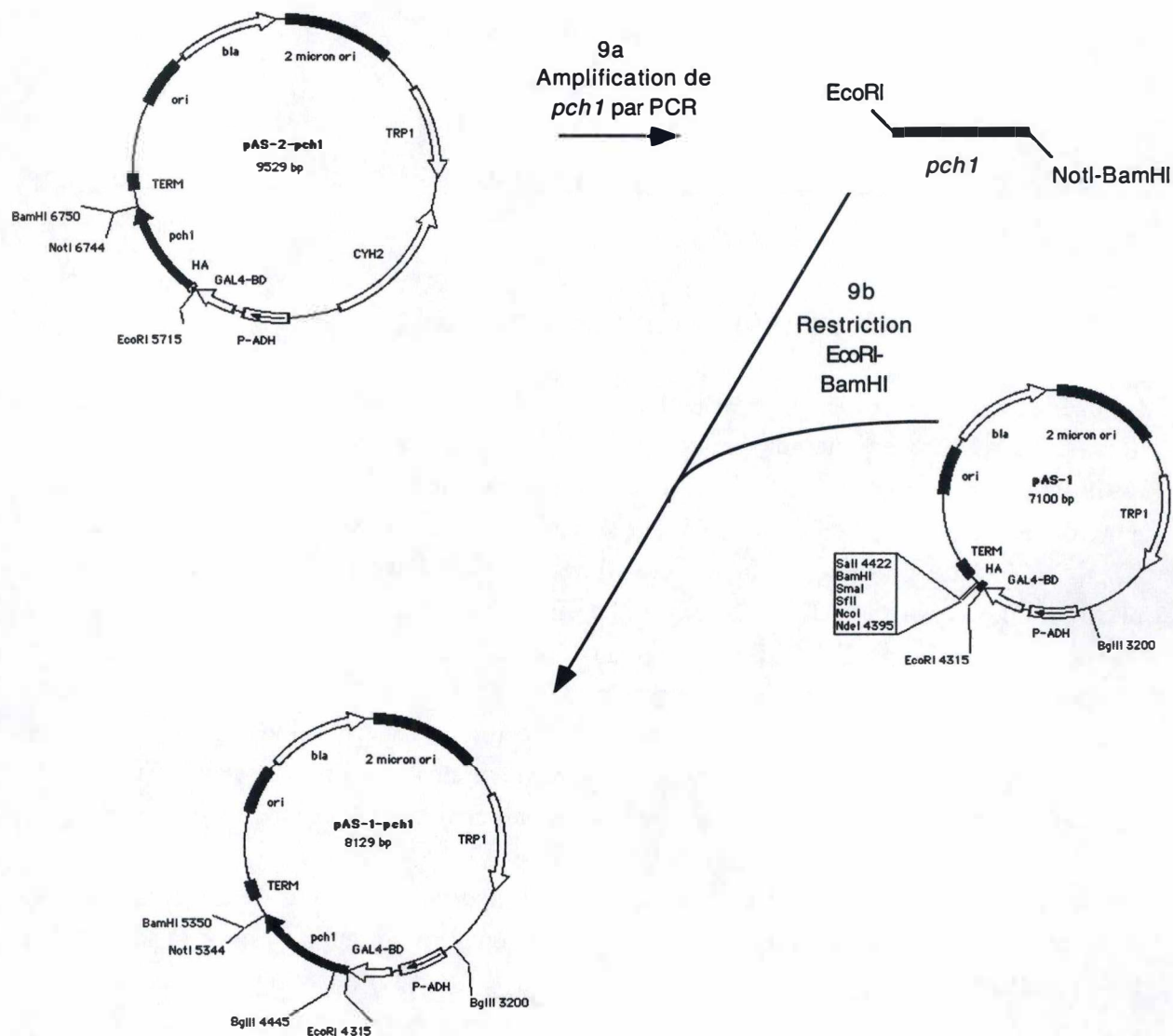
Les trois gènes rapporteurs utilisés lors de ce crible sont *URA3*, *HIS3* et *LacZ*.

URA3 : Ce gène encode l'Orotidine 5' décarboxylase, une enzyme requise dans le pathway de synthèse de l'uracile. La transcription de ce gène est essentielle sur un milieu dépourvu d'uracile. La transcription de ce gène peut être contre-sélectionnée en présence de 5-FOA qui est transformé en un produit toxique en présence du produit du gène *URA3*.

Promoteur : SPAL = SPO13 (promoteur d'un gène de sporulation fortement réprimé en condition normale) + *GAL4* Binding Site (Vidal *et al.*, 1996a; Vidal *et al.*, 1996b).

HIS3 : Le gène *HIS3* encode l'Imidazole glycérol phosphate déshydratase, une enzyme intervenant dans la synthèse de l'histidine. Le 3AT (matériels et méthodes) fonctionne comme inhibiteur de cette enzyme. En conséquence, plus la quantité de 3-AT dans le milieu est élevée, plus le gène *HIS3* doit être exprimé fortement pour que la cellule puisse atteindre le seuil de croissance.

Promoteur : Promoteur propre à *HIS3* auquel manque la séquence UAS endogène et auquel a été ajoutée une séquence UAS du gène *GALI*.



Restriction diagnostique <i>BglII</i>			
9c.	enzyme	site de restriction	longueur des fragments
	<i>BglII</i>	A'GATCT	1245 pb, 6884 pb

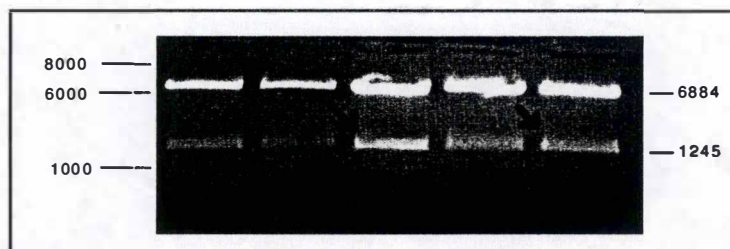


Figure 9: Schéma représentant les différentes étapes de la construction de pAS1-*pch1*

9a. Amplification de *pch1* par PCR à partir du plasmide pAS2-*pch1* avec des "primers" à bouts flottants contenant un site de restriction *EcoRI* (primer 5') ou *NotI*-*BamHI* (primer 3').

9b. L'amplicon est restreint par *EcoRI* et *BamHI* et *pch1* est alors cloné en aval du *GAL4 BD* dans le vecteur pAS1 restreint par les mêmes enzymes. Cette opération retire la séquence du tag HA présente dans le vecteur.

9c. Restriction *BglII* sur 5 minipréparations d'ADN montrant le profil de restriction attendu pour le pAS-1-*pch1*.

LacZ: Il s'agit d'un gène bactérien intégré dans le génome de levure. Il encode la β -galactosidase qui dégrade le galactose en glucose et lactose. De la même façon, cette enzyme peut cliver le X-GAL et libérer le chromophore X, qui confère une coloration bleue au milieu. Ainsi l'intensité de la couleur bleue reflète le niveau d'expression de *LacZ*. Ceci permet une estimation quantitative du niveau d'expression des gènes rapporteurs.

Promoteur : promoteur « full length » du gène *GALI*.

La souche Mav103 de *S. cerevisiae*, qui possèdent ces trois gènes rapporteurs, a été utilisée lors du crible double-hybride. Elle doit être transformée avec les deux plasmides suivants :

- plasmide de la banque d'ADNc : pACT (voir matériel et méthodes) à marqueur de sélection *LEU2*.
- plasmide contenant l'appât : pAS1 (voir matériel et méthodes) à marqueur de sélection *TRP1*.

2.3. Etapes préliminaires

2.3.1. Construction du pAS1-*pch1*

Le gène *pch1* a été amplifié par PCR à partir du plasmide pAS2-*pch1* en utilisant deux amorces à bouts flottants contenant les sites de restriction *EcoRI* pour l'amorce 5' et *NotI*-*BamHI* pour l'amorce 3'. Le produit PCR fut ensuite restreint par *EcoRI* et *BamHI* et cloné dans le plasmide pAS1, restreint par les mêmes enzymes de restriction, pour former le gène de fusion *GAL4-pch1*. De cette manière on retire également la séquence encodant le tag HA présente dans le pAS-1. Une spécificité faible a été observée dans des cribles à cause de la présence de l'épitope HA ce qui nous a incité à le retirer pour réaliser le crible (Fromont-Racine *et al.*, 1997).

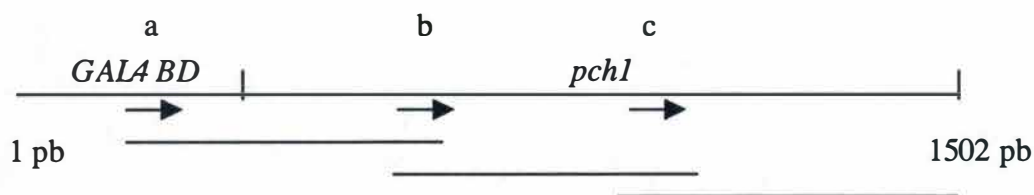
La construction de ce vecteur est présentée à la **figure 9**. La construction a été vérifiée par restriction diagnostique *BglII*.

Sur cinq colonies d'*E.coli* transformées avec le mélange de ligation pAS1-*pch1*. Des minipréparations d'ADN plasmidique ont été réalisées. La restriction diagnostique réalisée *BglII* sur ces colonies a donné le profil de restriction prévu (deux bandes: 1245 bp et 6884 bp) sur chacune des cinq pistes. Le gène *pch1* a donc été cloné avec succès dans le vecteur d'expression pAS1.

2.3.2. Séquençage du plasmide pAS1-*pch1*

Pour vérifier que l'insert *pch1* a bien été cloné dans le plasmide pAS1 en phase avec *GAL4-BD* sans avoir subi des mutations, nous avons procédé à un séquençage. Trois séquençages ont été réalisés avec les « primers » suivants:

- « DHGAL4/198 » (a) s'hybride aux bases 371-391 du gène de fusion *GAL4 BD-pch1*
- « DHpch1-1/199 » (b) s'hybride aux bases 821-840 du gène de fusion *GAL4 BD-pch1*
- « DHpch1-2/200 » (c) s'hybride aux bases 1261-1280 du gène de fusion *GAL4 BD-pch1*



Les résultats des séquençages ont montré que l'insert *pch1* a été cloné en phase avec *GAL4-BD*.

2.3.3. Vérification de l'expression de Gal4-Pch1 chez *S. cerevisiae*

Afin de vérifier que la protéine de fusion Gal4-Pch1 est bien exprimée chez *S. cerevisiae*, nous avons réalisé un Western blot avec les anticorps anti-Gal4-BD (CLONTECH) sur un extrait de protéines de la souche MaV103 transformée par le plasmide pAS1 vide ou le plasmide pAS1-*pch1*. Malgré plusieurs essais, nous ne sommes parvenus à détecter ni la fusion Gal4-Pch1, ni la protéine Gal4- seule, qui nous servait de contrôle positif.

Nous ne sommes donc pas parvenus à démontrer que la protéine de fusion Gal4-Pch1 est exprimée *in vivo*. Mais comme le séquençage n'a montré ni changement de phase ni mutation au niveau de l'insert *pch1*, nous sommes confiants que cette protéine est exprimée et nous avons décidé d'entamer le crible double-hybride avec la souche MaV103 transformée avec le plasmide pAS1-*pch1*.

2.3.4. Tests de transactivation basale

La majorité des protéines appât testées en double-hybride présentent un niveau d'activation basal des gènes rapporteurs qui dépend de la capacité de la protéine d'intérêt fusionnée au Gal4-BD de transactiver les gènes rapporteurs en absence du Gal4-AD. Ce niveau est estimé par les tests de transactivation, comme décrits ci-dessous.

2.3.4.1. Test de transactivation basale du gène rapporteur *URA3*

Pour tester le niveau de transactivation basale du gène rapporteur *URA3* par Gal4-Pch1, la souche MaV103 transformée par le plasmide pAS1-*pch1* ou le pAS1 seul a été striée sur du milieu SD-W-U. Aucune croissance n'a été observée sur ces boîtes. Ceci signifie donc que le gène rapporteur *URA3* n'est pas transcrit à un niveau suffisant pour permettre la croissance quand la seule protéine Gal4-Pch1 est présente.

2.3.4.2. Test de transactivation du gène rapporteur *HIS3*

Le test de transactivation du gène rapporteur *HIS3* est indispensable pour déterminer la concentration en 3 AT du milieu de culture utilisé lors du crible.

Lors de ce test, une série de boîtes à concentration croissante en 3 AT ont été préparées. La concentration en 3 AT à utiliser lors du crible va être déterminée par la capacité de Mav 103,

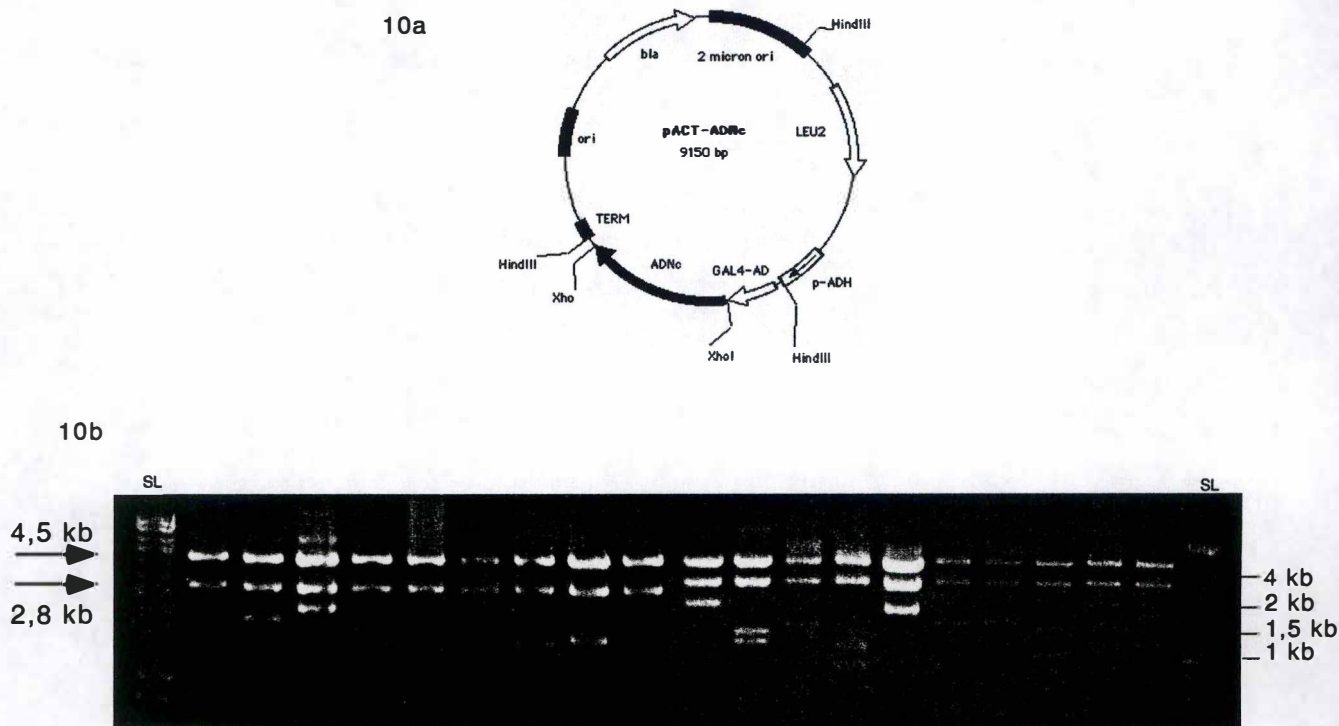


Figure 10: Analyse de la diversité de la banque d'ADNc

10a) Représentation du plasmide pACT, portant un insert d'ADNc fusionné à la séquence *GAL4 AD*. Cet insert a été cloné en *XhoI*.

10b) Gel d'agarose représentant les bandes obtenues par restriction *HindIII* réalisée sur des minipréparations issues de vingt colonies indépendantes. Le profil de restriction va dépendre de l'existence de sites de restriction *HindIII* au niveau des inserts d'ADNc et deux bandes constantes spécifiques du plasmide sont visibles (4,5 et 2,8 kb). On observe une bonne diversité des profils de restriction. La taille moyenne des inserts d'ADNc est estimée à 1,3 kb.

transformée avec pAS1-*pchl*, de pousser sur cette série de boîtes. Comme standard interne on a utilisé la souche MaV103 transformée avec deux plasmides codant pour les protéines de fusion Gal4-BD-E2F1 et Gal4-AD-Rb (fournis par M. Vidal) qui permettent une croissance jusqu'à une concentration en 3AT de 50 mM (Vidal *et al.*, 1996b).

Nous avons réalisé le test de transactivation de *HIS3* sur des concentrations en 3 AT de 10, 25, 50, 100 et 200 mM. Les levures exprimant la protéine de fusion Gal4-Pchl peuvent pousser jusqu'à une concentration de 50 mM de 3-AT, leur croissance est réduite sur 100 mM alors que plus rien ne pousse sur 200 mM de 3-AT. La concentration en 3AT retenue pour le crible est 100 mM.

2.3.4.3 Déroulement du crible et utilisation des gènes rapporteurs

La souche MaV 103 exprimant la fusion Gal4-Pchl est transformée par la banque d'ADNc de *S. pombe* fusionné au *GAL4-AD* dans le plasmide pACT.

Les cellules sont étalées sur SD-W-L-H + 3AT 100mM. Ce milieu permet de sélectionner la présence des deux plasmides puisqu'il ne contient ni tryptophane ni leucine et les clones pour lesquels le niveau d'expression du gène *HIS3* permet une croissance sur un milieu contenant 100 mM de 3AT.

Les clones retenus comme positifs sont alors restreints sur SD-W-L-U et SD-W-L + X-GAL : test de croissance qui est utilisé pour le rapporteur *URA3* et une coloration pour le rapporteur LacZ (voir matériel et méthodes).

2.3.4.4. Vérification de la banque d'ADNc

Un aliquot de la banque d'ADNc a été étalé sur boîte LBamp et incubé pendant une nuit. À partir de colonies isolées, 20 minipréparations ont été réalisées. Pour vérifier la diversité de la banque d'ADNc, des restrictions diagnostiques *HindIII* ont été réalisées sur ces minipréparations. Le profil de restriction *HindIII* est constitué d'une bande correspondant à 4500 bp et une bande correspondant à 2800 bp. Un ou plusieurs autres fragments de tailles variables sont attendus en fonction de taille et de la présence de sites de restriction *HindIII* dans le ADNc cloné. La **figure 10** présente les résultats de ces restrictions diagnostiques. En comparant les différents profils de restrictions au profil de restriction de pACT vide, nous pouvons conclure que tous les plasmides contiennent un insert. Vu que des combinaisons de bandes différentes sont visibles au niveau des différentes pistes, nous pouvons dire que la banque d'ADNc présente une bonne diversité sur l'échantillon testé. La moyenne de taille des inserts est de 1300 bp.

2.4. Déroulement du crible double-hybride

Nous avons réalisé dix-sept transformations avec chaque fois 30 µg de matériel plasmidique provenant de la banque d'ADNc. Les transformations ont été réalisées suivant le protocole "Trafo scale-up" (protocole: <http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/units/biochem/gietz/2HS.html>). Ce protocole diffère du protocole classique de transformation de levure par le fait que l'équivalent de 30 transformations est réalisé d'un coup, tous les réactifs étant multipliés par trente. Une certaine

hétérogénéité a été constatée dans l'efficacité de ces transformations et dans certains cas, le nombre de transformants était quasi nul comme le montre le tableau suivant. Au cours de ce travail, nous n'avons pas investigué la cause de ces variations. Les cellules transformées ont ensuite été étalées sur milieu SD-W-L-H pour les huit premières transformations et sur milieu SD-W-L-H-U (contenant toujours 100 mM de 3 AT) pour les transformations suivantes.

Transformations	Efficacité	Transformants	Clones positifs sur SD-W-H-L	Clones positifs sur SD-W-L-U	Clones positifs pour la colorat° X-GAL
A	$4,2 \times 10^4$	$1,26 \times 10^6$	8	6	1
B	30	900	2	1	1
C	/	/	/	/	/
D	10^4	3×10^5	/	/	/
E	/	/	/	/	/
F	9×10^2	$2,7 \times 10^4$	4	4	1
G	$1,2 \times 10^4$	$3,6 \times 10^5$	5	4	1
H	$2,4 \times 10^4$	$7,2 \times 10^5$	/	/	/
I	$2,4 \times 10^4$	$7,2 \times 10^5$	2	2	/
J	$1,5 \times 10^3$	$4,7 \times 10^4$	3	3	/
K	11×10^3	3×10^5	/	/	/
L	$9,78 \times 10^3$	3×10^5	6	6	/
M	15×10^3	$4,5 \times 10^5$	19	19	4
N	3×10^3	$9,5 \times 10^4$	3	3	/
O	5×10^2	5×10^2	5	5	/
P	$1,2 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	7	7	/
Q	$1,2 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	10	10	/
TOTAL		4 652 400	74	70	8

Pour chaque transformation on étale un échantillon de 10 µl sur SD-W-L, sélectionnant ainsi les levures contenant à la fois le plasmide proie et le plasmide appât. Ceci va nous permettre d'évaluer l'efficacité de chacune des transformations et de déterminer le nombre total de cellules criblées (voir tableau).

Les huit premières transformations donnant lieu à un « background » plus élevé qu'attendu sur base du test de transactivation basale (voir 2.3.4.2), les neuf autres transformations ont été étalées sur SD-W-L-H-U supplémenté par 100 mM de 3 AT afin de sélectionner la réponse des deux gènes rapporteurs *HIS3* et *URA3* simultanément. De cette façon, le background a été réduit, nous permettant de récupérer plus facilement les seuls clones positifs.

2.5. Analyse des huit premiers candidats

Bien que les 74 clones isolés lors de ce crible double-hybride représentent tous des candidats valables, nous nous sommes focalisés sur l'analyse des huit candidats (B12, F35, M50, M47, G2, M25, M45) qui répondent positivement aux trois gènes rapporteurs.

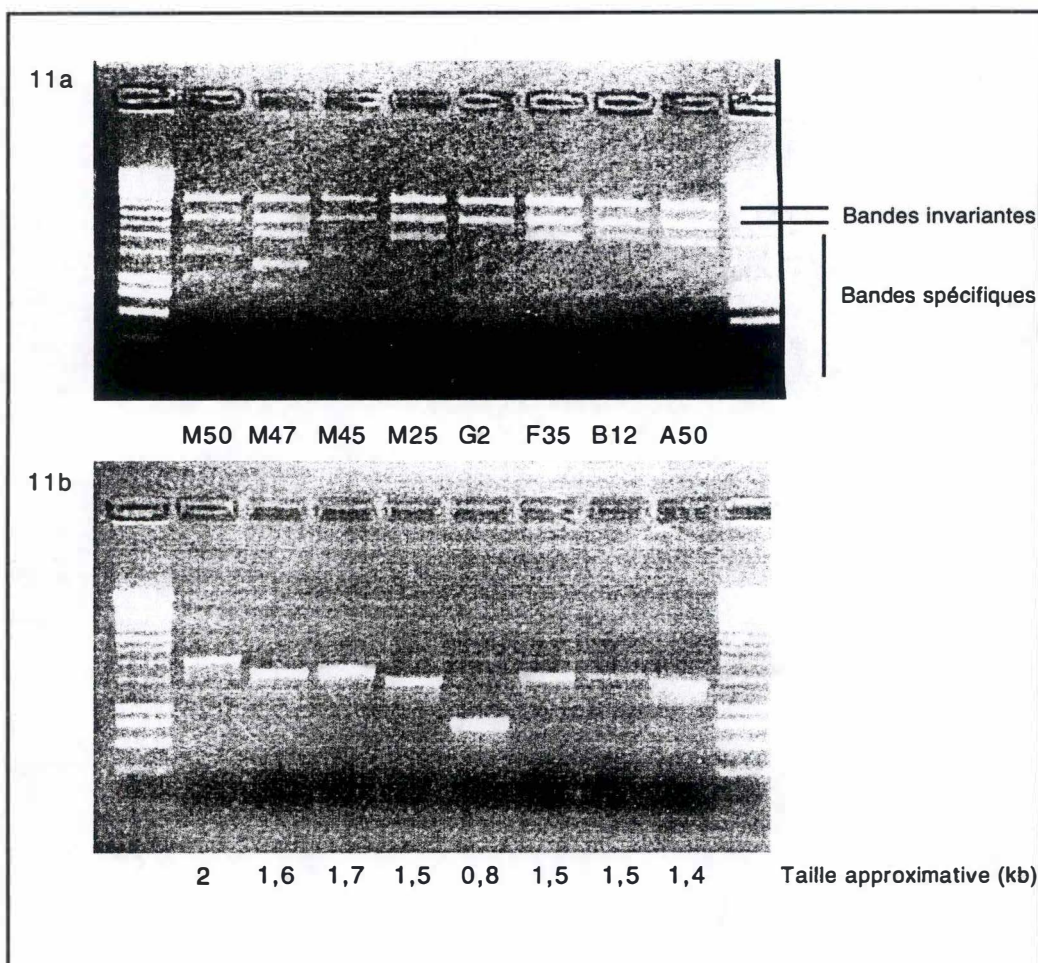


Figure 11: Préparation des inserts de huit clones isolés lors du crible double hybride

11a. Une minipréparation d'ADN plasmidique de levure a été réalisée sur les huit clones. Après électroporation dans la souche KC8 de *E. coli*, les plasmides ont été purifiés et une restriction diagnostique *Hind*III a été réalisée. Elle libère deux bandes invariantes (2800 bp et 4500 bp) correspondant à la matrice plus une série de bandes spécifiques de l'insert.

11b. Une amplification PCR a été réalisée sur ces préparations en utilisant des primers qui bordent les inserts de la banque clonés dans le pACT. Cette amplification permet donc de donner une taille approximative aux différents inserts. Chaque insert a ensuite été purifié et séquencé.

2.5.1. Récupération des plasmides de la banque et séquençage des inserts d'ADNc

Pour obtenir du matériel plasmidique utilisable en séquençage il faut passer par plusieurs étapes détaillées ci-dessous.

- 1) une extraction des plasmides de levure est d'abord réalisée, ce qui permet d'isoler les deux plasmides présents : le pAS1-*pch1* et le pACT- portant un insert d'ADNc.
- 2) pour amplifier sélectivement le plasmide proie, portant le marqueur de sélection *LEU2*, les extraits plasmidiques sont transformés dans une souche de *E.coli*, KC8, qui est mutée pour le gène *leuB*. Cette mutation pouvant être complémentée par le gène *LEU2* de *S. cerevisiae* porté par le plasmide proie, seuls les plasmides pACT portant un insert de la banque d'ADNc vont être amplifiés de cette façon. Vu la faible efficacité de cette opération, on doit procéder par électroporation. La sélection s'opère en deux étapes : le mélange d'électroporation est d'abord étalé sur milieu LB amp ; puis les cellules sont répliquées sur un milieu dépourvu de leucine afin de sélectionner les transformants qui contiennent le plasmide d'intérêt. Une minipréparation d'ADN plasmidique de ces cellules est ensuite réalisée.
- 3) Les minipréparations sont restreintes par *HindIII* pour vérifier d'une part l'authenticité du plasmide et pour détecter la présence d'un insert (**figure 11a**).
- 4) les inserts d'ADNc sont ensuite amplifiés par PCR. L'amorce en 5' s'hybride à 100 pb en amont de la fusion *GAL4-AD* / insert ADNc, et l'amorce 3' s'hybride au niveau du terminateur de transcription. Ceci permet d'amplifier l'insert d'ADNc cloné dans le vecteur pACT. Après migration sur gel d'agarose, la taille des inserts peut être estimée (**figure 11b**).
- 5) les amplicons sont séquencés après avoir été purifiés. Le séquençage est réalisé avec l'amorce 5' utilisée pour l'amplification PCR. Ceci permet de vérifier que l'insert est cloné en fusion avec le *GAL4-AD* et d'établir la séquence de l'insert. Le maintien de la phase entre le *GAL4-AD* et l'insert d'ADNc est un des critères intervenant dans la classification des candidats (Fromont-Racine *et al.*, 1997).

2.5.2. Etude des candidats

Sur les huit échantillons soumis au séquençage, sept ont permis d'obtenir une séquence. Les séquences des sept amplicons ont été soumises à une série d'analyse par BLAST (pour Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) pour vérifier qu'ils appartenaient bien au génome de *S. pombe* et trouver une homologie éventuelle avec des séquences apparentées. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le tableau suivant. Pour chaque clone, quatre données sont présentées.

- 1) la protéine de *S. pombe* encodée par l'insert
- 2) le nombre d'acide aminés total de cette protéine
- 3) la taille approximative de l'insert
- 4) la portion de la protéine encodée par l'ADNc présent dans l'insert
- 5) le cadre de lecture par rapport à *GAL4-AD*

2.5.1. Récupération des plasmides de la banque et séquençage des inserts d'ADNc

Pour obtenir du matériel plasmidique utilisable en séquençage il faut passer par plusieurs étapes détaillées ci-dessous.

- 1) une extraction des plasmides de levure est d'abord réalisée, ce qui permet d'isoler les deux plasmides présents : le pAS1-*pchl* et le pACT- portant un insert d'ADNc.
- 2) pour amplifier sélectivement le plasmide proie, portant le marqueur de sélection *LEU2*, les extraits plasmidiques sont transformés dans une souche de *E.coli*, KC8, qui est mutée pour le gène *leuB*. Cette mutation pouvant être complémentée par le gène *LEU2* de *S. cerevisiae* porté par le plasmide proie, seuls les plasmides pACT portant un insert de la banque d'ADNc vont être amplifiés de cette façon. Vu la faible efficacité de cette opération, on doit procéder par électroporation. La sélection s'opère en deux étapes : le mélange d'électroporation est d'abord étalé sur milieu LB amp ; puis les cellules sont répliquées sur un milieu dépourvu de leucine afin de sélectionner les transformants qui contiennent le plasmide d'intérêt. Une minipréparation d'ADN plasmidique de ces cellules est ensuite réalisée.
- 3) Les minipréparations sont restreintes par *HindIII* pour vérifier d'une part l'authenticité du plasmide et pour détecter la présence d'un insert (**figure 11a**).
- 4) les inserts d'ADNc sont ensuite amplifiés par PCR. L'amorce en 5' s'hybride à 100 pb en amont de la fusion *GAL4-AD* / insert ADNc, et l'amorce 3' s'hybride au niveau du terminateur de transcription. Ceci permet d'amplifier l'insert d'ADNc cloné dans le vecteur pACT. Après migration sur gel d'agarose, la taille des inserts peut être estimée (**figure 11b**).
- 5) les amplicons sont séquencés après avoir été purifiés. Le séquençage est réalisé avec l'amorce 5' utilisée pour l'amplification PCR. Ceci permet de vérifier que l'insert est cloné en fusion avec le *GAL4-AD* et d'établir la séquence de l'insert. Le maintien de la phase entre le *GAL4-AD* et l'insert d'ADNc est un des critères intervenant dans la classification des candidats (Fromont-Racine *et al.*, 1997).

2.5.2. Etude des candidats

Sur les huit échantillons soumis au séquençage, sept ont permis d'obtenir une séquence. Les séquences des sept amplicons ont été soumises à une série d'analyse par BLAST (pour Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) pour vérifier qu'ils appartenaient bien au génome de *S. pombe* et trouver une homologie éventuelle avec des séquences apparentées. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le tableau suivant. Pour chaque clone, quatre données sont présentées.

- 1) la protéine de *S. pombe* encodée par l'insert
- 2) le nombre d'acide aminés total de cette protéine
- 3) la taille approximative de l'insert
- 4) la portion de la protéine encodée par l'ADNc présent dans l'insert
- 5) le cadre de lecture par rapport à *GAL4-AD*

clone	protéines encodées	nbre d'aa de la protéine complète	taille de l'insert (kb)	portion de la protéine encodée (aa)	cadre
B12	Skb1	645	1.5	295-645	+1
F35	Skb1	645	1.5	295-645	+1
M50	Spk1	372	2.0	2-372	+1
M47	transketolase	684	1.6	204-684	+1
G2	homocystéine methyltransferase	764	0.8		+1 et -3
M25	Oxydoreductase	351	1.5		-3 et +3
M45	L-argininosuccinate lyase	459	1.7	1-459	+1

D'une manière générale, on ne trouve pas toujours dans une banque d'ADNc des inserts correspondant à l'ARN messager complet. Ceci est le plus souvent du au fait que la reverse transcriptase s'arrête en cours d'élongation. De ce fait un certain nombre de protéines exprimées sont tronquées. C'est le cas du clone B12 par exemple.

Il peut aussi arriver que la reverse transcriptase change de « template » en cours d'élongation, ce qui donnera lieu à des inserts composites comme c'est le cas par exemple du clone G2.

Analyse détaillée

Clone G2

Le Blast révèle que cet insert encode une protéine présentant une forte homologie avec une homocystéine methyltransferase de *S. pombe*. Cette protéine a une taille de 764 acides aminés. Une analyse plus précise révèle que l'insert possède une structure complexe. Les 234 premiers nucléotides code pour une portion de l'homocystéine methyltransferase mais le cadre de lecture est de -3 par rapport à *GAL4-AD*. On trouve ensuite la même séquence dans le cadre de lecture +1. Cette organisation ne correspond pas à la séquence présente dans le génome de *S. pombe* et reflète très probablement une erreur lors de la transcription inverse.

Lors d'un crible double-hybride réalisé au laboratoire en parallèle avec le notre, et utilisant un appât non apparenté à Gal4-Pch1 (Gal4-Skp1), le même clone a été isolé.

En conséquence, nous considérons ce clone un faux-positif.

Clone M25

Le Blast révèle une forte homologie avec une oxydo-reductase de *S. pombe*. Sa taille est de 351 résidus. Une organisation de l'insert similaire au clone précédent est présente. Les 161 premiers nucléotides sont en phase +3 par rapport à *GAL4-AD* et encode pour l'oxydo-reductase, tandis que la suite de la séquence codante est présente en phase -3.

Pour les même raisons évoquées pour le clone G2, nous considérons M25 un faux-positif.

Clone M45

Ce clone contient la séquence complète de la L-argininosuccinate lyase de *S. pombe* en phase avec Gal4-AD. Cette protéine de 459 aa intervient dans la biosynthèse de l'arginine .

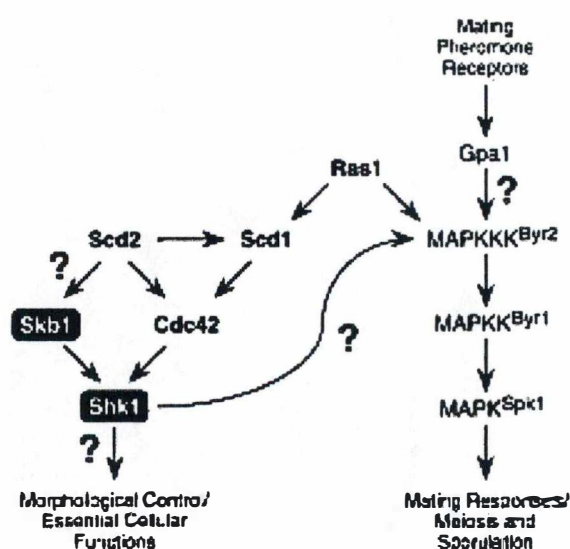
Comme tous les critères d'interaction sont remplis, il s'agit d'un clone positif.

Clone M47

Ce clone encode une version tronquée d'une transkétolase de *S. pombe*. Les derniers 480 acides aminés (sur 684) de la protéine sont fusionnés en phase avec Gal4-AD. Cette enzyme est indispensable à la production d'érythrose 4-phosphate et nécessaire à la biosynthèse des acides aminés aromatiques (Schaaff-Gerstenschlager *et al.*, 1993; Schaaff-Gerstenschlager and Zimmermann, 1993).

Clone B12 et F35

Ces deux clones encodent une version tronquée de la protéine Skb1 de *S. pombe*. Les derniers 350 acides aminés (sur 645) de la protéine sont fusionnés en phase avec Gal4-AD. La protéine Skb1 (Shklkinase binding) a été isolée comme régulateur de la PAK (p21 cdc42/Rac activated kinase) Shk1 (Gilbreth *et al.*, 1996 ; Marcus *et al.*, 1995) (voir figure ci-dessous et discussion générale). Skb1 et Shk1 interagissent en double-hybride. La kinase Shk1 est impliquée dans le contrôle de la morphologie cellulaire et est activée par Cdc42, une petite GTPase de la famille Rho (Gilbreth *et al.*, 1996). Ce pathway semble également impliqué dans le maintien de la polarité cellulaire et la coordination entre morphogénèse et cycle cellulaire en régulant directement le complexe Cdc2-Cdc13 (Gilbreth *et al.*, 1998; Verde *et al.*, 1998).



Clone M50

Ce clone contient la séquence complète de Spk1, une MAPK (mitogen-activated kinase) de *S. pombe* (Gotoh *et al.*, 1993). Cette séquence de 372 acides aminés est en phase avec Gal4-AD. La kinase Spk1 fait partie de la seconde branche du pathway régulé par la protéine Ras1 chez *S. pombe* (voir figure ci-dessus). Il s'agit d'une cascade de kinases qui répond aux phéromones de mating et est essentielle pour la conjugaison et la méiose (Gilbreth *et al.*, 1996). Les deux branches sont connectées par Shk1 qui est également requis pour la réponse aux phéromones (Tu *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998).

Conclusion

Au cours de cette seconde partie du travail, environ 70 clones interagissant en double-hybride avec Gal4-Pch1 ont été identifiés. Huit d'entre eux transactivent les trois gènes rapporteurs utilisés. Sur sept séquences obtenues, cinq ont été retenues comme positives après une analyse des séquences. Trois des ces clones encodent des protéines dont les fonctions sont apparentées et une d'entre elles est une kinase.

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

Discussion générale et perspectives

Les cyclines de type C représentent une famille de cyclines encore mal connue qui n'intervient pas, comme la plupart des autres cyclines dans le cycle cellulaire. La découverte que chez *S. cerevisiae* toutes les cyclines de type C, au nombre de trois, interviennent au niveau de la transcription a mené à considérer les complexes cyclines C/CDK comme étant des régulateurs transcriptionnels. Chez *S. cerevisiae*, une seule cycline C, Ccl1, est essentielle. Cependant, chez *S. pombe*, deux cyclines de type C essentielles ont été identifiées. Mcs2, qui est l'homologue de Ccl1, s'associe à la CDK Mcs6, mais le partenaire de la deuxième cycline C essentielle, Pchl, n'a pas encore été caractérisé. Afin d'identifier le partenaire de Pchl et d'éclairer la fonction associée à ce complexe cycline-kinase, nous avons procédé à deux types d'expériences.

Dans un premier temps, nous avons éprouvé l'hypothèse que Mcs6 soit le partenaire kinase de Pchl. Cette hypothèse repose sur le fait que Mcs2, la cycline associée à Mcs6, est apparentée à Pchl. Par ailleurs, les phénotypes terminaux des délétants *mcs2* et *pchl* partagent certains traits communs. Nous montrons ici que Pchl ne co-précipite pas Mcs6 et que la surexpression de Mcs6 n'affecte pas l'activité kinase précipitée par Pchl. Ces données semblent indiquer que Mcs6 n'est pas le partenaire de Pchl.

Cependant, la kinase co-précipitée avec Pchl phosphoryle une fusion GST-CTD avec une efficacité égale, sinon supérieure au complexe Mcs6-Mcs2.

Il existe donc, contrairement à ce que l'équipe de Paul Russell avait montré (Furnari *et al.*, 1997), une activité CTD-kinase claire associée à Pchl. Ceci suggère que le complexe Pchl/Kinase puisse intervenir dans la phosphorylation du CTD *in vivo* et ainsi participer à la régulation de la transcription par l'ARN polymérase II.

Dans le but d'identifier des partenaires de Pchl nous avons réalisé un crible double-hybride. Nous avons utilisé la souche de *S. cerevisiae* MaV 103 qui contient trois gènes rapporteurs de l'interaction : *URA3*, *HIS3* et *lacZ*. Cette souche a été transformée avec le plasmide pAS1-*pchl* qui code pour la protéine de fusion Gal4 BD-Pchl. Une série de transformations avec la banque d'ADNc de *S. pombe* ont ensuite été réalisées pour cribler une nombre total de 4,6x 10⁶ transformants.

Lors de ce crible nous avons isolé 74 clones qui transactivent le gène rapporteur *HIS3*. De ceux-ci, 70 transactivent *URA3*. Huit de ces derniers sont colorés légèrement sur milieu

contenant du X-GAL. Bien que le gène *lacZ* soit souvent utilisé comme gène rapporteur dont le niveau de transactivation reflète, selon l'intensité de la coloration des cellules en bleu, la force de l'interaction entre appât et proie, ceci n'est pas toujours vrai. Ainsi, un des contrôles positifs utilisé exprime les protéines de fusion Gal4 BD-E2F1 et Gal4 AD-Rb, mais ne colore pas sur milieu contenant du X-Gal alors que l'existence d'une interaction entre les protéines Rb et E2F1 est bien établie *in vivo* (Vidal *et al.*, 1996).

L'utilisation de trois gènes rapporteurs très différents vise à éliminer les faux positifs et à élargir les possibilités de détecter des interacteurs. En effet, l'organisation de la chromatine aussi bien que les séquences UAS_{GAL} présentes dans le promoteur des rapporteurs diffèrent d'un gène rapporteur à l'autre. La réponse d'un couple appât / proie peut donc varier fortement d'un rapporteur à l'autre, comme le montre le cas de E2F/Rb. Notre crible semble indiquer qu'en utilisant Gal4-Pchl comme appât, c'est le rapporteur *HIS3* qui possède le seuil d'activation le plus bas puisque tous les clones isolés transactivent ce rapporteur alors que seulement huit donnent lieu à une coloration bleue sur milieu contenant du X-Gal.

Lors de ce travail, nous avons choisi de commencer par séquencer les clones qui répondaient positivement pour les trois gènes rapporteurs.

Rappelons que la technique de crible double-hybride présente plusieurs biais. Ainsi cette technique utilise des protéines de fusion qui ne présentent pas toujours leur conformation native, des domaines d'interaction pouvant être cachées par la fusion avec la protéine Gal4. De plus, les protéines de fusion sont ciblées dans le noyau, ce qui n'est pas, pour un certain nombre, leur environnement naturel.

Ceci peut expliquer des phénomènes « d'interaction directionnelle », rencontrés régulièrement dans les cribles double hybrides. On parle « d'interaction directionnelle » quand une protéine qui en tant qu'appât est identifiée comme partenaire d'une protéine X, ne sera pas isolée lors d'un crible utilisant comme appât cette protéine X.

Une donnée double-hybride doit donc être prise pour ce qu'elle est : l'interaction de deux protéines de fusion dans un système artificiel. Les interactions rapportées devront être supportées par des données biochimiques (co-immunoprécipitation) ou génétiques (interaction génétique).

Durant notre travail, nous avons obtenu la séquence de sept clones positifs pour les trois gènes rapporteurs. Les protéines encodées par ces différents inserts sont indiquées dans le tableau suivant.

clone	protéine encodée
B12	Skb1 (tronquée)
F35	Skb1 (tronquée)
M50	Spk1 (« full length »)
M47	Transketolase (tronquée)
G2	homocystéine méthyltransferase
M25	Oxydoreductase
M45	L-argininosuccinate lyase (« full length »)

Les candidats G2 et M25 correspondant aux protéines homocystéine transférase et oxydoréductase respectivement ne sont pas en phase avec Gal4. L'organisation de l'insert d'ADNc, un morceau de l'ADN correspondant au même messenger, mais présent sur 1 brin puis sur l'autre, reflète des erreurs de transcription inverse. Nous considérons ces candidats comme faux positifs.

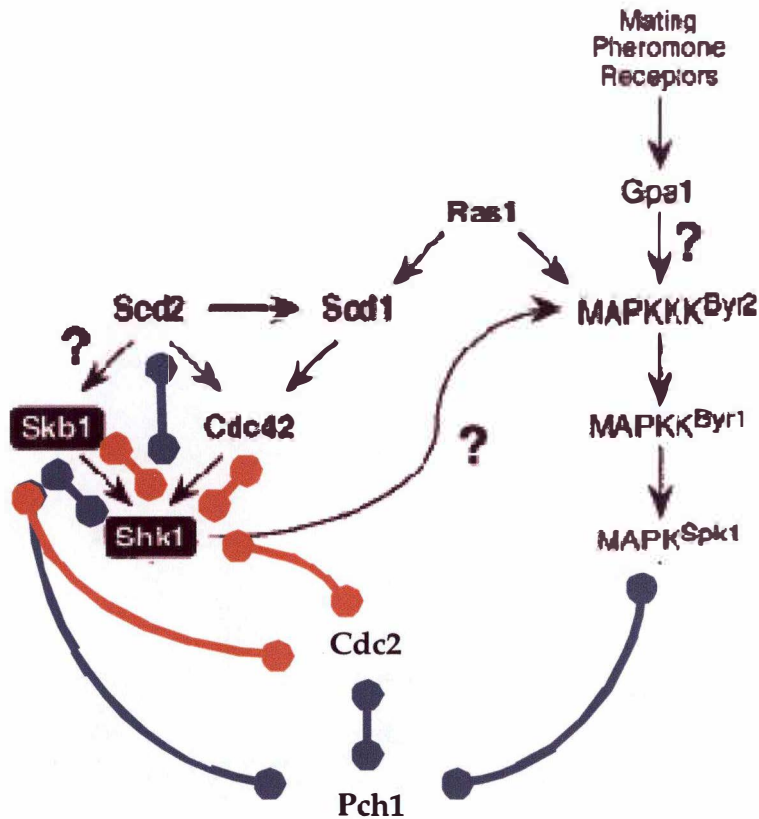
Les clones M47 et M45 encodent une transkétolase et la L-argininosuccinatelyase. Ces deux protéines sont des enzymes métaboliques. Les deux candidats répondent positivement aux trois rapporteurs et sont en phase avec Gal4. Selon ces critères, ils pourraient donc représenter des "interacteurs vrais" de Pch1. Cependant, dans l'état actuel des connaissances, il nous est difficile de spéculer sur le pathway biologique que ces interactions pourraient révéler.

Les clones B12 et F35 encode une version tronquée de la protéine Skb1, et le clone M50 encode la protéine-kinase Spk1. Ces deux protéines sont impliquées dans des processus biologiques apparentés et contrôlés par la protéine Ras1 chez *S. pombe* (voir schéma ci-dessous) (Gilbreth *et al.*, 1996 ; Gotoh *et al.*, 1993).

Skb1 (Shk1 kinase binding) est un régulateur de Shk1, une PAK, c'est à dire une kinase activée par la GTPase p21 Cdc42 (Rac). Shk1 est essentielle et coordonne la morphogénèse avec le cycle cellulaire (Gilbreth *et al.*, 1996; Sawin *et al.*, 1999) en interagissant directement avec le complexe Cdc2-Cdc13 (Gilbreth *et al.*, 1998).

La protéine Spk1 est une MAP (Mitogen Activated Kinase) qui intervient dans la transduction du signal engendré par les phéromones de mating (Gotoh *et al.*, 1993). Spk1 est, comme Shk1, contrôlée en partie par Ras1 (voir figure ci-dessous).

Les deux branches du pathway « Ras » sont connectées via Shk1 qui est requis à la fois pour le contrôle de morphogénèse et pour le processus sexuel (conjugaison et meiose).



Représentation schématique du pathway « Ras » chez *S. pombe* (modifié de Gilbreth *et al.*, 1996). Les interactions sont représentées en couleur. Les lignes bleues signifient que les deux protéines interagissent en double-hybride. Les lignes rouges signifient que les deux protéines peuvent être co-immunoprécipitées.

Plusieurs interactions double-hybride ont été détectées entre différents acteurs du pathway « Ras », ce qui suggère qu'un complexe pourrait exister *in vivo*. Ces données sont confirmées par co-immunoprécipitation (Gilbreth *et al.*, 1998; Gilbreth *et al.*, 1996; Marcus *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1999) (voir figure).

Récemment, un lien direct entre Shk1-Skb1 et Cdc2 a été établi. Shk1-Skb1 fonctionne comme inhibiteur de l'entrée en mitose en réponse à la morphogénèse. Cette inhibition se ferait de façon directe puisque Shk1-Skb1 co-précipite avec Cdc2 (Gilbreth *et al.*, 1998).

Comme le montre la figure ci-dessus, une combinaison d'interaction semble exister entre Skb1, Cdc2 et Pch1. En effet, Skb1 co-précipite avec Cdc2 comme nous venons de le

mentionner et Pchl a été isolée comme interagissant en double-hybride avec Cdc2 (Furnari *et al.*, 1997). Enfin, lors de ce travail, une interaction double-hybride a été détectée entre Pchl et Skb1.

Cette dernière donnée apporte un nouvel éclairage sur les résultats de l'équipe de Paul Russell (Furnari *et al.*, 1997). En effet, il est possible que Pchl et Cdc2 soit associées *in vivo* dans un complexe incluant au moins Skb1, sans pour autant être le partenaire catalytique de Cdc2.

L'interaction détectée avec Spk1 soulève d'autres questions. En effet, cette kinase est classée dans la famille des MAP kinases, des kinases apparentées d'un point de vue fonctionnel et structural aux CDKs. Les MAP kinases sont capables, dans certains cas, de phosphoryler les substrats des CDK *in vitro* et certaines phosphorylent le CTD de la polymérase II *in vitro* (Bonnet *et al.*, 1999).

La proximité entre les CDKs et les MAPs, est également révélée par les « Blasts » que nous avons réalisés (voir annexes). En effet en utilisant Cdc2 comme « sonde » contre le génome de *S. pombe* pour identifier les séquences qui encodent des protéines apparentées aux CDKs, les MAP kinases et Spk1 particulièrement, apparaissent comme les kinases les plus proches des CDKs.

Ces arguments permettent de poser l'hypothèse que Pchl soit un partenaire régulateur de Spk1 qui fonctionnerait alors comme « cyclin dependent kinase ».

Comme perspectives à ce travail, il sera nécessaire de retransformer les candidats obtenus dans la souche MaV103 exprimant Gal4-Pchl pour confirmer les interactions. L'utilisation de combinaisons de protéines taggées nous permettra ensuite d'étudier, chez *S. pombe*, la co-précipitation éventuelle des protéines dont nous venons de décrire les interactions détectées en double hybride.

Enfin, le séquençage des clones restants est entrepris et pourra compléter, nous l'espérons, les données déjà acquises.

Par la technique du double hybride, ce travail a permis d'ouvrir la possibilité de nouvelles connections entre des protéines autrement non apparentées. Cependant, ces connections potentielles reposent à ce jour sur ces seules interactions double-hybride. Il faudra, dans un avenir proche, les éprouver par des méthodes différentes.

MATERIEL & METHODES

Solutions et tampons

1.Solutions

Agarose

Une solution 1% est réalisée dans du tampon TAE 1x. Elle est ensuite chauffée à ébullition et le gel est coulé quand la solution a atteint environ 50°C.

Tampon de chargement pour gels d'agarose

		Pour 10 ml
Bleu de bromophénol	0,25%	25mg
EDTA	25mM	0,5 ml EDTA 0,5 M
Glycérol	50%	5 ml
Eau distillé		4,5 ml

Tampon de chargement pour gels protéiques

		Pour 100 ml
Glycérol	20%	20 ml
β -mercaptoéthanol	10%	10 ml
SDS 10%	4%	4 ml
Bleu de bromophénol	0,004%	0,004 mg

Ampiciline

Une solution 10 % est réalisée dans de l'eau distillée. Elle est ensuite stérilisée, sur un filtre Millipore 0,22 μ l. Lors de son utilisation, cette solution 10 % doit être diluée 10x.

Bradford

Solution-stock 5x à diluer et à filtrer sur filtre plissé

	Pour 200 ml
Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma B1131)	100 mg
Ethanol 95%	50 ml
H ₃ PO ₄ 85%	100 ml
Eau disitillée	50 ml

Bromure d'éthidium

Une solution 0,2% est réalisée dans de l'eau distillée. Elle est diluée 10000 x dans une solution d'agar 1%.

dNTP 20 mM (EUROGENTEC)

Le stock de dNTP se compose d'un mélange de 5 μ moles de chacune des 4 nucléotides. Lors de la PCR 4 μ l de cette solution est utilisée dans un volume final de 100 μ l.

Glycérol 100 %

Solution à autoclaver

Kinase Buffer

TRIS pH7	20 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	5 mM
MnCl ₂	2,5 mM
DTT	1 mM

Pour la réaction kinase, on ajoute 10 μ ci de (γ -³²P)ATP et 2 μ g de GST-CTD.

Solution d'acétate de lithium (LiAc 1M)

La solution de LiAc est préparée et stockée à la concentration de 1,0 M dans de l'eau distillée et est stérilisée par filtration. La solution ne doit pas être mise à pH car celui-ci peut varier entre 8,4 et 8,9 pour les applications réalisées.

Marqueur de poids moléculaire pour gels d'agarose (Smartladder Eurogentec)

La solution est prête à l'emploi. Pour pouvoir se référer au marqueur en ce qui concerne la taille et la concentration, il faut utiliser 5 μ l de solution par gel. Cette solution est conservée à 4 °C.

Taille	Quantité (Totale = 720 ng)
1000 bp	100 ng
8000bp	80 ng
6000 bp	60 ng
5000 bp	50 ng
4000 bp	40 ng
3000 bp	30 ng
2500 bp	25 ng
2000 bp	20 ng
1500 bp	15 ng
1000 bp	10 ng
800 bp	80 ng
600 bp	60 ng
400 bp	40 ng
200 bp	20 ng

PBS 10x

Tampon phosphate	100mM
NaCl	1,5 M

PBS/Tween 1x

PBS	1x
Tween 20	0,05 à 0,1 %

PBS/Tween/milk (blocking reagent)

		Pour 1 L
PBS	1x	1L
Tween20	0,05%	500 µl
Lait en poudre	5%	50 g

PEG (polyéthylène glycol) 50%

Dissoudre 50g de PEG 3350 dans 35 ml d'eau stérile dans un berlin. Faire dissoudre complètement le PEG dans l'eau au moyen d'un barreau magnétique. Transférer la solution

dans un cylindre gradué de 100 ml. Rincer bien les parois du berlin avec une petite quantité ajoutée dans le cylindre. Amener la solution à un volume de 100 ml et mélanger par inversion. Le PEG peut être stérilisé soit par l'autoclave, soit par filtration au travers d'un filtre de 0,45 μm . Le PEG doit être stocké dans une bouteille fermée pour éviter que l'évaporation de l'eau ne change la concentration de la solution. En effet, même une légère augmentation de la concentration optimale du PEG peut engendrer une diminution de l'efficacité de transformation.

Persulfate d'ammonium (PAS)

Une solution 10% est réalisée dans de l'eau bidistillée. Stocker à 4 °C.

RNAase A

Solution stock à une concentration de 10 mg par ml d'eau bidistillée. Chauffer pendant 20 minutes à 100 °C pour éliminer les DNAases et aliquoter et stocker à -20°C.

Running gel (12%)

Acrylamide/Bisacrylamide (29,2%/0,8%)	8 ml
TrisHCl 1,5M, pH 8,8	5 ml
Temed	8 μl
SDS 10%	200 μl
PAS 10%	200 μl
H ₂ O	6,6 ml

Single-strand Carrier DNA

Peser 200 mg d'ADN de haut poids moléculaire (Deoxyribonucleic Acid Sodium Salt type III from Salmon Testes, Sigma D 1626) dans 100 ml de TE Buffer. Disperser l'ADN dans la solution grâce à une pipette 10 ml. Mixer vigoureusement avec un agitateur magnétique jusqu'à ce que tout soit dissous.

Aliquoter l'ADN par un ml et le conserver à - 20°C.

Avant l'utilisation, la solution doit être bouillie pendant 5 minutes et ensuite être rapidement mise sur glace.

Stacking Gel

AcrylamideBisacrylamide (29,2%/0,8%)	1 ml
TrisHCl 1,5M, pH 8,8	0,75ml
Temed	6 µl
SDS 10%	60 µl
PAS 10%	60 µl
H ₂ O	4,1 ml

Tampon de stripping

	Pour 100 ml
Tris HCl pH 6,7 1,5M	4.2ml
β-mercapto-ethanol 100mM	700 µl
SDS 10%	20ml
eau distillée	porter à volume

Triaminotriazol (3-AT)

Solution stock 2M. Dans 10 ml d'H₂O distillée sont ajoutées 1,68 g de 3-AT. Comme le 3-AT risque de se dégrader par stérilisation dans l'autoclave, il est filtré au travers d'un filtre 0,2µm. Comme il s'agit d'un produit toxique, il faut toujours utiliser des gants.

5-bromo 4-chloro 3-indoyl, β-D galactopyranoside (X-Gal)

Une solution 80 mg/ml est réalisée dans du N-N diméthylformamide. Stocker à -20 °C.

1.2.Tampons**Tampon N2 (équilibrage de la colonne)**

KCL	900 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	6,3

Tampon N3 (lavage)

KCL	1150 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	6,3

Tampon N5 (élution de l'ADN)

KCL	1000 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	8,5

Tampon de ligation 5X

TrisHCl pH 7,4	20 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT (dithiothreitol)	10 mM
ATP	1 mM

Tampon phosphate 0,5M pH7,2

Na ₂ HPO ₄	0,5 M
NaH ₂ PO ₄	0,5 M

Tampon P1 (tampon de resuspension)

Tris HCL pH 8	50 mM
EDTA pH 8	10 mM

Tampon P2 (tampon de lyse)

NaOH	200mM
SDS	1%

Tampon P3 (tampon de neutralisation)

Acétate de potassium	2,55 mM
----------------------	---------

Le pH de 4,8 est à ajuster avec une solution d'acide acétique 37%. Cette solution ne doit pas être autoclavée.

Breaking Buffer

		Pour 100 ml
Triton X-100	2%	2 ml
SDS 20%	1%	5 ml
NaCl 5M	100mM	2 ml
Tris 1M pH 8	10mM	1 ml

Tampons de restrictions

Tampons Biolabs

Les différents tampons				
Composition (mM)	1	2	3	4
Bis Tris Propane HCl	10	-	-	-
MgCl2	10	10	10	-
DTT	1	1	1	1
TrisHCl	-	10	50	-
NaCl	-	10	100	-
Tris acétate	-	-	-	20
Mg acétate	-	-	-	10
K acétate	-	-	-	50
pH à 25 °C	7	7,9	7,9	7,9

Tampons BRL

Les différents tampons											
Composition (mM)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
TrisHCL	50	50	50	20	10	50	50	20	*	100	10
MgCl2	10	10	10	5	8	6	10	10	**	10	12
NaCL	-	50	100	-	-	50	50	-	-	150	-
KCl	-	-	-	50	-	50	50	-	***	-	10
pH	8	8	8	7,4	8,2	7,4	8	7,4	7,9	7,6	9

- * 20 mM tris-acétate
- ** 10 mM Mg-acétate
- *** 50 mM K-acétate

Enzymes de restriction utilisées lors de ce travail :

*Bam*H1 G/GATCC
 C CTAG/G

*Bgl*II A/GATCT
 TCTAG/A

*Eco*RI G/AATTC
 CTTAA/G

*Hind*III A/AGCTT
 TTCGA/A

Kpn GGTAC/C
 C/CATGG

*Not*I GC/GGCCGC
 CGCCGG/CG

*Sal*I G/TCGAG
 CAGCT/G

*Ssp*I AAT/ATT
 TTA/TAA

*Xba*I T/CTAGA
 AGAT/CT

*Xho*I C/TCGAG
 GAGCT/C

Tampon de transfert pour Western Blot

		Pour 1 L
TRIS	48 mM	5,8 g
Glycine	35 mM	2,9 g
SDS	0,037%	0,37 g
Méthanol	20%	200 ml
H ₂ O		800 ml

TAE 50X

Tris HCl pH 8	40 mM
EDTA	0,002 M
Acide acétique glacial	51,7 ml

RIPA buffer

Tampon PBS pH7	10 mM
Triton X-100	1%
SDS	0,1%
EDTA	2 mM
NaCl	150 mM
NaF	50 mM
PMSF (Phényl Méthyl Sulfonate Fluoride)	1 mM

Préparer la solution, qui peut être stockée à 4 °C. Ajouter extemporairement le PMSF.

PMSF

Solution stock 100 mM:

éthanol	10 ml
PMSF	174 g

STOP buffer

		Pour 250 ml
NaCl	150 mM	2,2g
NaF	50 mM	0,52 g
EDTA	10 mM	0,93 g
NaN ₃	1 mM	16,3 mg

Mettre à pH 8.

2. Milieux de culture

Tous les milieux sont autoclavés à 120 °C pendant 20 minutes. Les éléments thermolabiles (ampicilline, 3-AT...) sont stérilisés par filtration et ne seront rajoutés qu'après autoclave quand la solution a atteint une température d'environ 60 °C. C'est aussi à cette température que les milieux solides sont coulés sur boîte de Pétri.

2.1. Milieu pour bactéries

2.1.1. Milieu LB (Luria Bertani)

		Pour 400 ml
Tryptone	1 %	4 g
NaCl	0,5 %	2 g
Yeast extract	0,5 %	2 g

Pour un milieu solide, il faut rajouter 2% d'agar.

Les bactéries sont mis en culture à 37°C, sous agitation pour les cultures liquides.

2.1.2. Milieu SOC

C'est une solution très riche en sels que l'on ajoute rapidement aux cellules ayant subi une décharge électrique lors d'une transformation par électroporation.

	Pour 500 ml
Tryptone	10 g
Yeast extract	2,5 g
NaCl	0,3 g
KCl	0,93 g
Mg SO ₄	1,01 g
Mg Cl ₂	1,23 g
Glucose	2 g
Eau distillée	495 ml

Stériliser par autoclave, et aliquoter en falcon 50 ml.

2.1.2. Milieu minimum : milieu à base de la solution saline M9

Milieu M9amp-Leu :

Solution 1 : 150 ml d'agar 4%, autoclaver.

Solution 2 :

Pour 150 ml :

M9	20x	15 ml
Mix AA	10x	30 ml
Uracile	1%	1 ml
Tryptophane	1%	1 ml
Histidine	1%	1 ml
Dextrose	20%	3 ml
Thiamine	1M	0.3 ml

Mélanger les deux solutions (maintenir les solutions à 55°C), puis ajouter :

MgSO ₄	1M	300_1
CaCl ₂	0,1M	300_1
Ampicilline	100mg/ml	300_1

Couler sur boîtes de pétri. Le volume de milieu correspond à 12 boîtes de pétri (9 cm de diamètre).

Milieu M9 20x :

Pour 500ml :		
Na ₂ HPO ₄	12%	60g
KH ₂ PO ₄	6 %	30g
NH ₄ Cl	2%	10g
NaCl	1%	5g

Porter à 100ml avec de l'eau distillée, puis stériliser par autoclave 20 minutes à 120°C.

2.2. Milieux pour levures

2.2.1. *S. pombe*

2.2.1.1. Milieu riche

Pour un litre de milieu YES (Yeast Extract Supplemented), 35 capsules de milieu lyophilisé de la firme BIO101 sont placés dans un litre d'eau distillée. Ce milieu doit être autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

2.2.1.2. Milieu minimum

EMM (Edimburg Minimal Medium) est une poudre fournie par la firme BIO101 dont la quantité à utiliser est de 32g /litre. Ce milieu ne contient ni uracile, ni adénine, ni leucine ni histidine.

2.2.1.3.Milieu minimum supplémenté

Les solutions stocks suivantes sont réalisées dans de l'eau distillée. Les solutions seront diluées selon les marqueurs de sélection utilisés.

Leucine (50x): 1,25 g /100 ml

Histidine (100x): 0,75 g /100 ml

Adénine (50x): 0,375 g /100 ml

Uracile (50x): 0,375 g / 100 ml

2.2.2. *S. cerevisiae*

2.2.2.1.Milieu riche YPD

		Pour 200 ml
Yeast extract	1 %	2 g
peptone	2%	4 g
glucose	2%	4 g

Pour obtenir un milieu solide, on ajoute de l'agar 2%.

2.2.2.2.Milieu minimum SD

		200 ml
YNB	0,17%	0,34 g
NH ₄ SO ₄	0,5%	1 g
Agar	2,5%	5g
Eau bidistillée		160 ml

Après l'autoclave on ajoute du glucose 20 % et le mix d'acides aminés.

		Pour 200 ml
Glucose 2	20%	20 ml
A.A. mix	10x	20 ml

2.2.2.3. Mix d' Acides Aminés/bases 10X

Dissoudre dans 800 ml d'eau distillée :

Adénine	/	/	0.3g	Phenylalanine	Phe	F	0,6 g
Sérine	Ser	S	4,0 g	Isoleucine	Ile	I	0,3 g
Valine	Val	V	1,5 g	Proline	Pro	P	0,3 g
Glutamate	Glu	E	1,0 g	Méthionine	Met	M	0,3 g
Lysine	Lys	K	0,5 g	Thréonine	Thr	T	2,0g
Tyrosine	Tyr	Y	0,6 g	aspartate	Asp	D	1,2 g
arginine	Arg	R	0,3 g				

Eléments à rajouter selon le marqueur de sélection utilisé:

		Pour 1 litre
Leucine	1%	5 ml
Histidine	1%	3 ml
Tryptophane	1%	3 ml
Uracile	1%	3 ml

Remarques

- l'uracile précipite à température ambiante. Il faut la mettre au bain-marie quelques minutes pour dissoudre le précipité.
- Le tryptophane est une molécule sensible à la lumière ainsi qu'à la chaleur. La solution-stock est conservée à 4°C et emballée dans du papier aluminium.

2.2.2.4. Coloration X-Gal pour levures

Préparer une solution d'agarose 1% (5ml par boîte). La garder à 50°C.

Préparer une solution phosphate de potassium 1M à pH7 (5ml par boîte). La placer à 50°C.

Mélanger l'agarose et la solution phosphate de potassium + 0,1 ml de SDS 10% + 0,6 ml de DMF (N,N-Diméthylformamide) + 0.2 ml de X-Gal 2% dissous dans le DMF.

Verser le mélange sur la boîte, incubé quelques heures à 30°C.

Solution phosphate de potassium :

K_2HPO_4 : 17,4g/100ml

KH_2PO_4 : 13,6g/100ml à autoclaver, 20 minutes à 120°C.

Pour 100ml d'une solution « K- PO_4 » 1M pH7, on prend 61,5ml de K_2HPO_4 et 38,5ml de KH_2PO_4 .

Solution-stock X-Gal, 2% :

Peser 1g de X-Gal et le dissoudre dans 50 ml de DMF, aliquoter par un ml en eppendorfs.

Conserver à -20°C.

3. Souches, plasmides et banques

3.1. Souches

3.1.1 Levures

3.1.1.1 *S. cerevisiae*

MaV103

(*leu2-3 112* , *trp 1-901*, *his 3Δ200*, *ade2-101*, *gal4Δ*, *gal 80Δ*, *SPAL10 : :URA3*, *GAL1 : :LacZ*, *Gal1 : :His3 @ lys2 can1^R cyh2^R*)

Cette souche a été construite pour le crible doubl-hybride. Ainsi, des séquences UAS_{GAL} ont été intégrées dans le promoteur des gènes *lacZ* et *LEU2* alors qu'une séquence promotrice SPAL a été intégrée en amont du gène rapporteur *URA3*. Les gènes *URA3*, *HIS3*, *GAL4* et *GAL80* du génome de la souche ont été mutés ou délétés.

Cette souche a été fournie par le Dr. Marc Vidal

3.1.1.2. *S.pombe*

96116 (KGY461)

(*h+ ade6-20 ura4-D18 leu-32 his 3-D1*)

(Stock de laboratoire)

GP33

(*h+N ade6-216 ura4- leu1-32*)

Cette souche a été fournie par le Dr. Guillaume Cottarel.

3.1.2. Bactéries

DH10B (Gibco-BRL)

(*F⁻ mcrA*, *Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)*, *φ 80dlacZΔM15*, *ΔlacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, *Δ(ara, leu)7697*, *galU*, *galK*, *λ⁻*, *rspL*, *nupG*).

KC8

(*hsdR*, *leuB 600*, *trpC9830*, *pyrF : :Tn5*, *hisB463*, *lacDX74*, *stra*, *gal U*, *K*). Le transposon *Tn5* lui confère une résistance à la kanamycine.

Cette souche de *E.coli* est mutée dans les gènes *trpC*, *leuB* et *hisC* , mais ces mutations peuvent être complémentés par les gènes *TRP1*, *LEU2* et *HIS3* de *S.cerevisiae*. Cette souche a été fournie par le Dr. Tomi Makela.

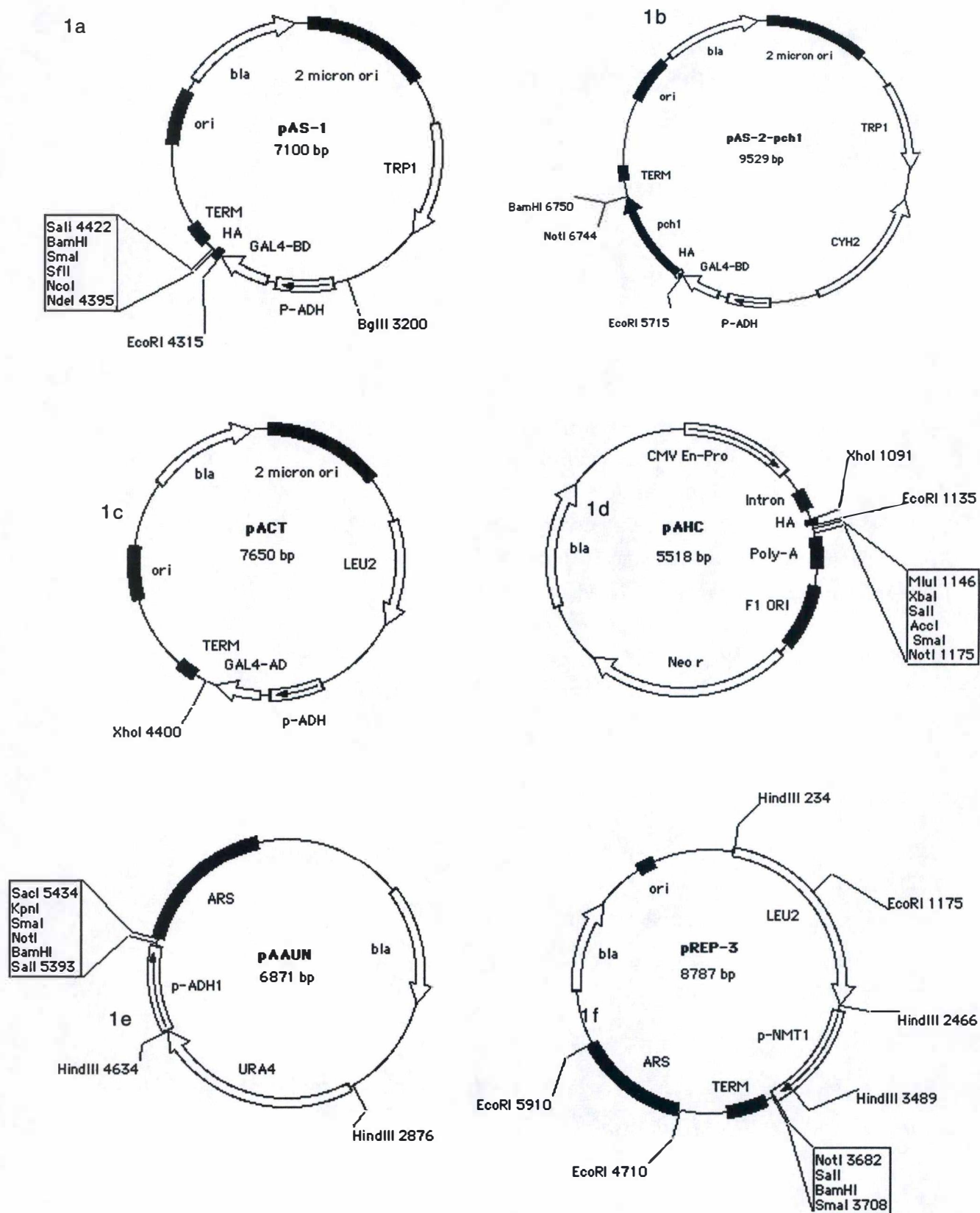


Figure 1: représentation schématique des différents plasmides utilisés (voir texte)

3.2. Plasmides

pAS1 (figure 1a)

Ce plasmide a servi de plasmide appât du crible double hybride. Il contient une séquence 2 μ ori, qui fait fonction d'origine de répllication multicopie chez *S. cerevisiae*, et une origine de répllication bactérienne ori. Comme le plasmide contient en plus les marqueurs de sélection *TRP1* et *bla*, qui sont des marqueurs de levure et de bactéries respectivement, ce plasmide fonctionne comme « plasmide navette » entre *S. cerevisiae* et *E.coli*.

La séquence codante pour *le GAL4-BD*, suivi de la séquence du tag HA, est flanquée d'un site multiple de clonage. L'expression de la protéine de fusion sera contrôlée par le promoteur ADH-1.

Ce plasmide nous a été fourni par Beth Furnari.

pAS2-pch1 (figure 1b)

Le pAS-2 est identique au pAS-1 sauf qu'il possède en plus le gène *CYH 2* qui confère la sensibilité au cycloheximide.. La figure 1b montre pAS2 contenant l'insert *pch1*.

Ce plasmide nous a été fourni par Beth Furnari.

pACT (figure 1c)

La banque d'ADNc de *S. pombe* utilisée dans ce travail a été construite dans ce plasmide. Il contient une origine de répllication bactérienne et de levure (ori et 2 μ ori) et les marqueurs de sélection *bla* et *LEU 2*. La séquence codante pour *le GAL4-AD* est flanquée d'un site multiple de clonage. Ce plasmide a été fourni par Beth Furnari.

pAHC (figure 1d, D. Hermand, non publié)

Le pAHC est un vecteur d'expression pour cellules supérieures. Il contient entre autre une origine de répllication bactérienne et le marqueur *bla*. La séquence du tag HA est flankée par un site multiple de clonage.

pAAUN (figure 1e, Xu *et al.* 1990)

Le pAAUN est un vecteur d'expression de *S. pombe*. Il contient les marqueurs de sélection *bla* et *ura4*. C'est un vecteur navette entre *E. coli* et *S. pombe*. Le promoteur ADH-1 est suivi directement par un site multiple de clonage. Ce plasmide a été fourni par le Dr. Guillaume Cottarel.

pAHA (Hermand *et al.* 1998)

Le pAHA est une version modifiée du pAAUN permettant de cloner des séquences en aval de la région codante du tag HA et ainsi d'exprimer chez *S. pombe* des protéines de fusions HA

pREP3 (figure 1f, Maundrell K., 1993)

Le pREP3 est un vecteur d'expression de *S. pombe*. Il contient les marqueurs de sélection *bla* et *leu2*. C'est un vecteur navette entre *E. coli* et *S. pombe*. Le promoteur *nmt-1* est suivi directement par un site multiple de clonage. Ce plasmide a été fourni par le Dr. Guillaume Cottarel.

3.3. La banque d'ADNc

La banque d'ADNc de *S.pombe* utilisée a été fournie par Beth Furnari .Les ADNc sélectionnés ont une taille supérieure à 600 pb et ont été cloné dans le pACT en *XhoI* pour permettre leur expression en fusion avec le domaine transactivateur de Gal4.

La banque est amplifiée sur milieu solide. Pour ce faire, on étale sur 15 grandes boîtes de pétri à raison de ca. 5000-6000 colonies par boîte. Ces colonies sont ensuite raclées et une préparation d'ADN plasmidique est réalisée.

4.Méthodes relatives aux protéines

4.1. Le Western Blot

4.1.1. Préparation de la culture cellulaire

Inoculer des cellules dans 50 ml de milieu minimal adéquat (dépendant de la souche utilisée), jusqu'à ce qu'elle soit à une D.O.₅₉₅ de 0,25 (= 5×10^6 cellules/ml), de façon à avoir $2,5 \times 10^8$ cellules en tout.

4.1.2. Préparation de l'extrait protéique

*) Centrifuger les cellules à 3000 rpm pendant 5 minutes. Laver 1 fois dans 5 ml de Stop Buffer froid et transférer cette solution dans un falcon 2058 de 15 ml. Centrifuger à 5000 rpm pendant 5 minutes. Il faut ensuite bien drainer le culot. Ce culot peut être congelé à -70°C .

*) Resuspendre le culot dans 20 μl de HB buffer. Ajouter 1,5 ml de petites billes en verre (0,5 mm de diamètre, Sigma G 9268) et vortexer pendant une minute. Laver les billes avec 1 ml de tampon HB et centrifuger pendant 15 minutes à 4°C .

Reprendre le surnageant dans un eppendorf.

Note: pour préparer des extraits dénaturés, le tampon RIPA a été utilisé à la place du tampon HB.

4.1.3. Dosage protéique

4.1.3.1. Droite d'étalonnage Bradford

Afin de pouvoir déterminer la concentration en protéines dans l'extrait préparé, il faut établir une droite d'étalonnage à l'aide du réactif de Bradford et différentes dilutions d'une solution protéique de BSA (bovin serum albumine), à concentration connue de $100 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$. Le réactif de Bradford colore les protéines, de façon aspécifique. Cette méthode a été choisie pour sa rapidité et sa facilité, mais aussi pour sa sensibilité : elle permet la détection de concentration variant entre 1 et $10 \mu\text{g}/\text{ml}$.

En pratique, on procède de la manière suivante :

Faire des dilutions du BSA, dans des cuvettes de spectrophotométrie, comme suit :

BSA (μl)	Bradford(μl)	Concentration en protéines(μg/ml)
0	1000	0,5
5	995	1
10	990	5
50	950	10
100	900	15
150	850	20

Couvrir ensuite chaque eppendorf d'un parafilm et agiter brièvement. Laisser réagir 5 à 10 minutes à température ambiante. Lire l'absorbance à 595 nm. Réaliser toutes les mesures en double, afin d'augmenter la précision du dosage.

A partir des moyennes des valeurs obtenues, établir une droite d'étalonnage de la concentration de BSA en fonction des valeurs de densité optique.

4.1.3.2. Détermination de la concentration protéique

Diluer 10 μl de l'extrait protéique avec 990 μl de Bradford dans une cuvette de spectrophotométrie. Procéder ensuite de la même manière que pour les échantillons BSA. Reporter la valeur de la densité optique obtenue sur le graphe de la courbe d'étalonnage afin d'en déduire la concentration protéique.

4.1.4.Électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS page)

Le principe de cette électrophorèse unidimensionnelle est de séparer, dans des conditions dénaturantes, des protéines suivant leur masse moléculaire pendant que celles-ci migrent à travers la matrice d'un gel de polyacrylamide. Le gel de polyacrylamide est constitué de molécules d'acrylamide qui sont reliées entre elles par des molécules bifonctionnelles comme le N-N' méthylènebisacrylamide. Selon la taille des protéines que l'on désire séparer, on utilise des gels à concentration variable en acrylamide. Plus les protéines que l'on veut séparer sont petites, plus la concentration en acrylamide doit être élevée:

Concentration en acrylamide (%)	Echelle linéaire de séparation (kD)
15	12-43
10	16-68
7,5	36-94
5,0	57-212

Le détergent utilisé ici est le SDS, un détergent qui déplie les protéines tout en s'y liant de façon aspécifique par rapport à leur séquence primaire. Le SDS confère ainsi le même rapport charge sur masse à toutes les protéines, qui vont dorénavant ne migrer qu'en fonction de leur taille.

Le gel de polyacrylamide est constitué de 2 parties : le stacking gel et le running gel.

Le stacking gel est un gel de tassement qui forme la partie supérieure du gel. Ce gel sert à concentrer l'échantillon sur une même ligne. Ceci a l'avantage que les protéines entrent toutes au même instant dans le running gel. Comme le stacking gel est plus poreux que le running gel, la migration sur le stacking gel s'opère moins rapidement que celle sur le running gel.

4.1.5. Mise en œuvre de l'électrophorèse

- Positionner 2 spacers entre 2 plaques de verre.
- Ces plaques en verre doivent être vigoureusement nettoyées avant utilisation, avec de l'eau puis avec de l'éthanol afin de permettre une polymérisation uniforme des gels.
- Fixer les plaques à l'aide d'un dispositif à vices.
- Couler le running gel.
- Couvrir le running gel avec 1 cm d'eau bidistillée, afin de permettre une polymérisation uniforme du gel à sa surface. Laisser polymériser pendant 30 minutes.
- Enlever l'eau avec du papier Whatman
- Déposer le peigne avant de couler le stacking gel.
- Couler le stacking gel. Enlever les bulles qui se forment en bas des puits, en agitant légèrement le peigne, avant que le gel ne devient solide.
- Laisser polymériser pendant 30 minutes.
- Enlever délicatement le peigne et enlever les bulles d'air qui se sont formées dans les puits en les remplissant avec du tampon.
- Placer le support dans la cuve et remplir de tampon d'électrophorèse.
- Préparer parallèlement les échantillons protéiques auxquels est ajouté le tampon de chargement 5X. Le bleu de chargement s'intercale dans les protéines et évite de cette façon que les protéines ne remontent dans le puit. Avant le chargement, faire bouillir le mélange bleu/protéines pendant 5 minutes avant de le mettre sur glace.
- Charger les échantillon. Un puit supplémentaire sera réservé au marqueur de poids moléculaire (Bio Rad prestained SDS-Page standards low range) :

Poides moléculaire (kDa)	protéine
101	Phosphorylase B
79	Bovine serum albumine
50	Ovalbumin
34	Carbonic anhydrase
28	Soybean trypsin inhibitor
20	lysozyme

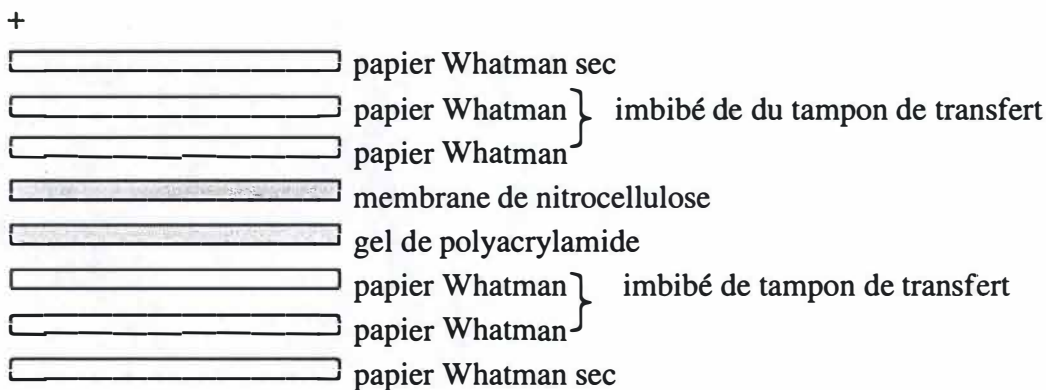
- Faire migrer à ampérage constant (40mA) jusqu'à ce que le front de migration ait atteint le bas des plaques.

- Démouler délicatement le gel, en utilisant l'extrémité du spacer pour décoller les 2 plaques de verre.
- Couper le coin supérieur droite du gel afin de l'orienter.

4.1.6. Le transfert protéique sur membrane de nitrocellulose (Western Blot)

Le but de cette étape est de transférer les protéines du gel de polyacrylamide sur une membrane de nitrocellulose. La membrane de nitrocellulose est facilement manipulable et peut même être conservée à 4 °C pendant une longue période.

Le montage suivant est réalisé:



Les six papiers Whatman ainsi que la membrane de nitrocellulose doivent avoir une surface identique à celle du gel. Pour éviter des irrégularités au niveau du transfert, il est important de bien éliminer toutes les bulles qui se trouvent entre gel et membrane à l'aide d'une pipette pasteur qu'on fait rouler doucement sur la membrane. Placer ce dispositif entre deux électrodes en carbone.

Afin de permettre un transfert optimal et pour éviter de brûler les électrodes, le transfert se fait à des valeurs de voltage basses (13V). La valeur de l'ampérage correspond à 3x la surface du gel.

4.1.7. Coloration Ponceau

Pour vérifier si le transfert s'est bien déroulé, on peut appliquer une coloration Ponceau à la membrane de nitrocellulose. La solution concentrée de Ponceau se compose de 2% de 3-hydroxy-4-(2-sulfo-4-(sulfo-phénylazo)phénylazo)-2,7-naphtalène disulfonic acid) dans 30% d'acide trichloroacétique et 30% d'acide sulfosalicyclique. Cette solution de coloration concentrée est diluée 10 X dans de l'eau pour être prête à l'utilisation. La membrane doit être bien rincée à l'eau distillée pour éliminer les sels qui empêchent la fixation du ponceau. Le ponceau est ensuite éliminé par lavage avec du PBS.

4.1.8. Elimination des sites de liaison non-spécifiques sur la membrane

Avant de pouvoir procéder à la détection antigénique, il est absolument indispensable d'éliminer tous les sites de liaison non-spécifique de la membrane. Pour cela on utilise le tampon de blocking PBS/Tween/milk. La solution doit être filtrée avant utilisation. La membrane est immergée pendant une heure (ou pendant la nuit à 4°C) dans un grand volume de PBS/tween/milk.

On enlève ensuite la solution de blocage et lave la membrane 3 x 15 minutes sous agitation dans du PBS-Tween 0,05%.

4.1.9. Mise en présence de l'anticorps primaire

La concentration du réactif immunologique varie de 1 à 50 mg/ml, en fonction de l'affinité des immunoglobulines pour leur épitope. Pour une immunodétection, les anticorps sont dilués à une concentration de 1 à 50 µg/ml.

La membrane est mise en présence de l'anticorps primaire (10 µl dans 10 ml de PBS-Tween) sous agitation pendant une heure. La solution contenant les anticorps est ensuite récupérée et la membrane est lavée 3x 15 minutes avec la solution PBS-Tween sous agitation.

4.1.10. Mise en présence de l'anticorps secondaire

Ce sont des anticorps dirigés contre le domaine F(c) des anticorps primaires. Les anticorps secondaires les plus couramment utilisés seront dirigés contre des Ig murins ou de lapins. Ils sont conjugués à la peroxydase. La membrane est mise en présence des anticorps secondaire (10 µl dans 10 ml de PBS-tween) pendant 20 minutes à 1 heure. Ensuite elle est lavée 3x 15 minutes avec la solution PBS-tween sous agitation.

4.1.11. La détection

Nous avons utilisé la méthode ECL (amersham pharmacia biotech)

Les solutions de détections ECL 1 et 2 contenant respectivement du luminol et du peroxyde d'hydrogène sont conservées à 2-8°C et à l'abri de la lumière.

Pour la détection, les 2 solutions sont mélangées puis étalées sur la membrane de nitrocellulose pendant exactement une minute.

La détection est basée sur le principe de chemiluminescence. La chemiluminescence est définie comme étant l'émission de lumière résultant de la dissipation d'énergie provenant d'une substance en état excité, suite à une excitation provoquée par une réaction chimique.

En présence de peroxyde d'hydrogène, la peroxydase oxyde le luminol qui se retrouve ainsi dans un état excité. La lumière émise par le luminol atteint son maximum après 5 à 20 minutes.

4.1.12. L'exposition

Après avoir emballé la membrane de nitrocellulose dans du plastique Saranwrap, on la place sous un film photographique à des temps variant entre 30 secondes et 30 minutes. Il est important de manipuler la membrane avec des gants afin d'éviter de contaminer avec des protéines.

4.1.13. La révélation

Le film autoradiographique est immergé successivement dans 3 solutions:

- | | | | |
|----|------------------------|---|---------|
| 2. | Solution de révélation | } | (Kodak) |
| 3. | Eau distillée | | |
| 4. | Solution de blockage | | |

4.1.14. Etape de Stripping

On peut effectuer éventuellement d'autres réaction d'immunodétection sur la même membrane, en utilisant des anticorps primaires différents. Pour cela, il faut "stripper" c.à.d. décrocher, les anticorps primaires par une étape de dénaturation.

On procède comme suit:

- Incuber la membrane 30 minutes à 50°C en présence d'un tampon de »stripping »
- Laver 2x 15 minutes au TBS, sous agitation et à température ambiante.
- Recommencer l'étape de blocking, l'hybridation et la détection.

4.2. La co-immunoprécipitation

4.2.1. Principe

Cette technique permet la purification d'une protéine au moyen d'anticorps dirigés contre elle ou un peptide auquel elle est fusionnée. Les anticorps précipitent parce qu'ils sont liés, par leur partie F(c), à la protéine A, elle-même chimiquement couplée à une bille de sépharose. (Protéine A-Sépharose ; Sigma). La protéine A est une protéine isolée de la bactérie *S. aureus*. Elle y fait partie de la membrane cellulaire où elle joue un rôle de protection en captant les anticorps dirigés contre la bactérie par leur partie Fc.

Lors de la co-immunoprécipitation, les billes de sépharose entraînent en même temps la protéine d'intérêt qui est liée par les brins F(ab)₂ des et une éventuelle protéine partenaire de la protéine d'intérêt.

De cette façon peut-on isoler des partenaires encore inconnus de la protéine d'intérêt ou vérifier l'interaction entre la protéine d'intérêt et un partenaire potentiel

4.2.2. Formation du complexe immunitaire lié à la protéine A-Sépharose

- Préparer les échantillons protéiques (voir point 4.1.2.).
- Dosage des protéines comme en 4.1.3.
- Ajouter 1 µl d'anticorps anti-HA à 600 µl d'extraits protéiques correspondant à une quantité d'environ 1 mg de protéines et incubé pendant 1 heure à 4°C..
- Ajouter 60 µl de protéine A-Sépharose (25% dans du PBS) au mélange anticorps/protéines et incubé pendant 1 heure à 4 °C.

4.2.3. Lavages

- Centrifuger à 3000rpm pendant 3 minutes à 4 °C et enlever le surnageant. Procéder à 4 lavages successifs utilisant chaque fois 800 µl de HB buffer afin d'éliminer toutes les protéines liées de façon non-spécifique aux complexes immunitaires précipités.
- Enlever le plus de surnageant possible en veillant à ne pas enlever le culot qui est assez transparent.

4.2.4. Caractérisation des protéines partenaires de la protéine d'intérêt

Nous nous sommes intéressés ici spécifiquement à l'interaction entre la protéine d'intérêt et un seul partenaire potentiel que nous avons marqué par un tag.

Pour analyser cette interaction, nous avons procédé à un Western Blot classique en utilisant des anticorps primaires dirigés contre ce tag (voir étapes 4.1.4. à 4.1.13)

4.3. Kinase assay

4.3.1. Principe

Cette technique permet de caractériser l'activité *in vitro* d'une protéine kinase sur différents substrats. La phosphorylation d'un substrat par une protéine kinase immunoprécipitée, en présence d'ATP radioactif ($^{32}\text{P}^*$), dépend de l'affinité de cette protéine pour ce substrat *in vitro*. Plus cette affinité est grande, plus le substrat sera phosphorylé et plus la bande radiographique qui lui correspond sera intense après migration sur gel protéique et révélation sur film autoradiographique.

4.3.2. Réalisation pratique

- Après immunoprécipitation de la protéine kinase (voir 4.2), un Master Mix est préparé. Ce mix contient les réactifs suivants:
 - substrat GST-CTD (4 μl , environ 2 μg)
 - ATP*(1 μl , 10 μCi)
 - kinase buffer (6 μl).
- Ajouter le master mix à l'échantillon protéique et incubé pendant 15 minutes à 30 °C.
- Mettre le bleu de changement qui fait arrêter la réaction de phosphorylation.
- Charger sur gel protéique et laisser migrer pendant 60 minutes à courant constant (40 mA).
- Démouler le gel qui est emballé ensuite dans du saran-wrap puis le placer en présence d'un film autoradiographique.
- Mettre la cassette pendant une nuit à -80°C, afin d'éviter une diffusion des bandes.
- Révéler comme en 4.1.13

5. Méthodes relatives à l'ADN

5.1. Les réactions de restriction

5.1.1. Principe

Une enzyme de restriction est une endonucléase qui coupe l'ADN en des sites spécifiques. Ces enzymes hydrolysent le lien phosphodiester couplant deux nucléotides, libérant des fragments d'ADN dont l'un est bordé par un phosphate à l'extrémité 5' et l'autre est bordé par un groupement hydroxyle à l'extrémité 3'. On différencie les endonucléases sur le mode de coupure:

- coupures en bouts francs, par exemple : *EcoRV*, ...
- coupures en bouts collants qui peuvent être à leur tour
 - à extrémités 5' protrudantes, par exemple : *SacI*, *KpnI*, ...
 - à extrémités 3' protrudantes, par exemple : *EcoRI*, *BamHI*, ...

5.1.2. Réalisation pratique.

La réaction nécessite la mise en présence dans un eppendorf des composants suivants :

- l'ADN à restreindre
- la ou les enzymes de restriction (On considère que 5 unités sont suffisantes pour restreindre 1 µg d'ADN. (Cette règle doit être modulée en fonction de l'occurrence des sites).
- le tampon de restriction (concentré 10x)
- l'eau distillée pour amener au volume final désiré (de 20 à 50 µl).

La restriction se déroule à une température optimale de 37°C durant une heure.

La réaction est arrêtée par ajout de tampon de changement ou par élévation de température pour les enzymes thermosensibles.

Les enzymes sont stockées à -20°C.

5.1.3. Remarques.

1. Toutes les enzymes de restriction ne travaillent pas à une température de 37°C. Exemples: L'enzyme *Sma* I restreint à une température de 25°C tandis que *Bcl* I travaille à 50°C et *Taq*I à 65 °C.
2. La quantité d'enzyme nécessaire varie de 3 à 10 unités/μg d'ADN à restreindre. Le volume ne doit pas excéder 1/10ème du volume final car les enzymes sont conservées dans du glycérol. Si la concentration de glycérol excède 5%, alors 2 phénomènes peuvent se produire:
 - soit l'activité enzymatique diminue et la restriction est, dans ce cas, partielle;
 - soit l'enzyme acquiert une activité "star"

L'activité "star" d'une enzyme se manifeste sous des conditions particulières telles qu'une température élevée, une force ionique élevée, une forte concentration en ADN cible, la présence de solvants organiques. Cette activité consiste en l'hydrolyse des liens phosphodiester en des sites similaires mais non identiques aux sites spécifiques de clivage de l'endonucléase. On trouve cette activité "star" chez, par exemple, *Eco*RI, *Hind*III et *Sal*I.

5.2. La déphosphorylation d'une matrice linéarisée

Après la digestion de l'ADN plasmidique par des enzymes de restriction, on retrouve des groupements 5' phosphate et 3' hydroxyle à l'endroit de coupure. Ces groupements sont nécessaires à la formation de liens phosphodiester en présence de la ligase. En enlevant les groupements 5' phosphate à l'aide d'une phosphatase, le vecteur ne peut plus se fermer sur lui-même. Le fragment d'ADN que l'on désire insérer possède toujours ses groupements 5' phosphate et peut former des liens phosphodiester avec les groupements 3' hydroxyle du vecteur. Il en résulte un vecteur présentant 2 cassures de part et d'autre de l'insert. C'est la bactérie hôte qui, après transformation, va reconstituer un double-brin intact.

La phosphatase que nous avons utilisée est la SAP (shrimp alkaline phosphatase). Pratiquement, dans un volume de 20 μl, on place:

1. 10 μl d'ADN à déphosphoryler (100 ng/μl)
2. 1/10^e de volume tampon 10X
 - 1 unité de phosphatase
 - de l'eau distillée pour mettre à volume.

La réaction de déphosphorylation se fait pendant une heure à 37°C et est arrêtée en mettant l'éppendorf pendant 10 minutes à 65°C.

5.3. Electrophorèse analytique sur gel d'agarose

Lors de l'électrophorèse analytique, des échantillons d'ADN chargés dans des puits d'un gel d'agarose migrent de la cathode vers l'anode sans se dénaturer. Les molécules de bromure, ajoutés à l'agarose liquide, s'intercalent entre les bases de l'ADN. Quand le bromure d'éthidium est excité par un rayonnement ultraviolet de 302 nm il devient fluorescent, ce qui permet de détecter la présence d'ADN. Ce type d'électrophorèse ne permet pas seulement de séparer les fragments d'ADN, mais aussi d'estimer leur concentration et leur taille. Ainsi peut-on vérifier la taille de l'ADN plasmidique restreint (voir plus loin). Une autre possibilité offerte par cette méthode est d'estimer la qualité de la préparation ainsi que son degré de purification.

-Séparer les fragments d'ADN

La vitesse de migration des fragments d'ADN dans un gel dépend de plusieurs paramètres :

LA TAILLE des molécules ou fragments d'ADN : au plus un fragment est grand, moins vite il migrera. La migration s'effectue de manière inversement proportionnelle au logarithme du poids moléculaire.

LE POURCENTAGE D'AGAROSE : au plus le pourcentage d'agarose est élevé, au plus on sépare efficacement les fragments de petite taille.

Agarose (%)	Tailles séparées de façon optimale (kb)
0,5	30 à 1
0,7	12 à 0,8
1,0	10 à 0,5
1,2	7 à 0,4
1,5	3 à 0,2

L'INTENSITE DU CHAMP ELECTRIQUE : la migration sera d'autant plus rapide que l'ampérage est important.

La **CONFORMATION** de la molécule d'ADN un même plasmide migre différemment sur gel selon qu'il est linéarisé ou circulaire.

-Estimer la taille

Le Smartladder eurogentec est un marqueur de taille, prêt à l'usage, qui a été conçu pour la quantification facile aussi bien que pour la détermination de taille des fragments d'ADN. Le Smartladder montre 14 bandes espacées régulièrement représentant des tailles allant de 200 à 10000 paires de base. Pour chaque migration sur gel d'agarose, on doit utiliser 5 µl de marqueur.

-Estimer la concentration

La concentration des bandes du marqueur étant connue, il suffit de comparer visuellement l'intensité de la bande d'intérêt avec une bande de taille apparentée dans le marqueur.

Mise en œuvre :

- dissoudre la quantité adéquate d'agarose dans le tampon TAE.
- chauffer à ébullition.
- couler le gel dans une cuve en plexiglas et placer le peigne.
- ajouter le bromure d'éthidium à une concentration de 2 mg par ml.
- laisser polymériser puis enlever le peigne.
- immerger le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie de TAE 1x
- ajouter le tampon de chargement aux échantillons. Le bleu de bromophénol est un alourdisseur qui maintient les échantillons dans le bas des puits.
- déposer les échantillons dans les puits du gel d'agarose.

5.4. La purification de l'ADN.

Suite à une électrophorèse préparative sur gel d'agarose, l'ADN plasmidique restreint peut être récupéré et purifié par 2 méthodes différentes afin de pouvoir l'utiliser de façon spécifique dans une réaction de ligation:

1. la récupération sur matrice
2. la récupération sur colonne.

5.4.1. La récupération sur matrice.

Le temps nécessaire pour effectuer cette récupération est de 20 minutes.

Les étapes sont :

- exciser la bande d'intérêt du gel d'agarose au moyen d'un scalpel. Cette opération doit être réalisée le plus rapidement possible afin de diminuer l'exposition de l'ADN aux ultraviolets qui lui sont néfastes.
- Poser les bandes de gel dans des eppendorfs et déterminer le volume approximatif (1g = 1 ml).
- ajouter trois volumes de solution stock NaI (Iodure de sodium 6 M) du « MBI Fermentas extraction kit », incuber entre 45 et 55°C pendant 5 minutes pour dissoudre l'agar.
- vortexer la solution-matrice avant l'emploi et ajouter 5 µl de cette solution dans l'eppendorf. Incuber 5 minutes à 55°C. Agiter de temps en temps.
- Le quickspin qui suit sert à faire précipiter la matrice avec laquelle l'ADN a formé un complexe.
- Enlever le surnageant.
- laver le culot 3 fois avec 500 µl de la solution de lavage fournie dans le kit.

- centrifuger à grande vitesse pendant 5 secondes. Enlever le surnageant.
- éluer le DNA, en 2 étapes, dans 8 puis dans 7µl d'eau, pour récupérer finalement 15µl de solution contenant les plasmides.
- resuspendre 2µl de cette solution à laquelle on ajoute 7µl d'eau et le tampon de chargement. Ce mélange est chargé sur gel pour contrôler si l'extraction a bien marché.

5.4.2. La récupération sur colonne.

Cette technique utilise le kit "Qiaquick Spin" fourni par la Société QIAGEN.

Le temps nécessaire pour effectuer cette récupération est de 20 minutes.

Les étapes sont :

- exciser la bande d'intérêt du gel d'agarose au moyen d'un scalpel. Cette opération doit être réalisée le plus rapidement possible afin de diminuer l'exposition de l'ADN aux ultraviolets qui lui sont néfastes.
 - pour chaque 100 mg de gel d'agarose, ajouter 300 µl de tampon QG fourni dans le kit. Pour des gels d'agarose plus concentrés (2%), ajouter le double du volume du tampon QG.
 - incuber les échantillons 10 minutes à 50 °C. Vortexer les échantillons toutes les deux à trois minutes pour faciliter la dissolution de l'agarose. Après dissolution complète, vérifier que la couleur de la solution est jaune. Si elle est orange ou violette, le pH a changé. Dans ce cas, ajouter 10 µl d'acétate de sodium 3M, à pH 5. L'adsorption de l'ADN sur la colonne est optimale à pH égal ou inférieur à 7,5.
 - *ajouter un volume d'isopropanol (égal au volume de la bande) et mélanger.*
 - charger chaque échantillon sur une colonne QIAquick et placer chaque colonne sur un tube de 2 ml, et centrifuger 1 minute à 13000 rpm.
 - ôter le surnageant et replacer la colonne sur le tube, ajouter 750 µl de tampon PE, pour laver la colonne. Laisser 5 minutes sur table, puis centrifuger à vitesse maximale pendant 1 minute.
 - ôter le surnageant et centrifuger à nouveau une minute à vitesse maximale.
- L'éthanol résiduel inhibe les réactions ultérieures.
- placer la colonne sur un eppendorf de 1,5 ml et ajouter 50 µl d'eau sur le centre de la membrane. Laisser sur table 5 minutes et centrifuger 60 secondes à vitesse maximale. L'ADN peut aussi être élué dans du tampon EB (Tris HCl 10 mM, pH8,5), fourni dans le kit.

5.5. La réaction de ligation.

5.5.1. Principe.

La réaction de ligation consiste en la formation de liens phosphodiesters entre une extrémité 3'-OH et une extrémité 5'-PO₄³⁻. Cette réaction est catalysée par une enzyme du phage T4 : la T4 DNA ligase. De cette façon, on peut facilement intégrer un insert dans un plasmide restreint, en un lieu déterminé. Pour fonctionner l'enzyme a besoin de Mg²⁺ et d'ATP.

5.5.2. Réalisation pratique.

La ligation est une réaction qui nécessite la mise en présence de divers réactifs :

- la matrice restreinte
- l'insert restreint en des sites identiques ou compatibles à ceux de la matrice
- le tampon de ligation (5X)
- la T4 DNA ligase
- de l'eau bidistillée pour mettre au volume désiré.

Généralement, cette réaction se fait dans un volume minimal, afin de favoriser l'activité de l'enzyme.

Composition du tampon de ligation :

La ligation peut se dérouler à une température de 16 °C toute la nuit ou sur table pendant deux heures, ou les deux méthodes utilisées de manière successive. On recherche un compromis entre activité et stabilité. A la température de 16°C, l'enzyme offre une grande stabilité mais une faible activité. A 25°C, l'enzyme présente une forte activité mais est moins stable.

5.6. La préparation d'ADN.

5.6.1. Minipréparation d'ADN plasmidique des bactéries.

Cette méthode a pour but d'isoler l'ADN plasmidique présent dans une souche. Cet ADN va nous permettre de vérifier, par exemple si les constructions réalisées sont obtenues ou bien si le clone dont provient l'ADN est le clone d'intérêt. La quantité d'ADN récupéré (quelques µg) est suffisante pour réaliser quelques restrictions diagnostiques

5.6.1.1.Culture des cellules.

- lancer des cultures de 5 ml de LB Amp, inoculées par un peu de colonies.
- incuber une nuit à 37°C sous agitation.

5.6.1.2.Lyse des cellules.

- transvaser 1,5 ml de chaque culture dans un eppendorf.
- centrifuger les colonies, 5 minutes à vitesse maximale.
- ôter le surnageant et ajouter 300 µl de P1 RNAase afin d'éliminer l'ARN, ajouter 300 µl de P2 pour lyser les cellules. Laisser agir pendant 5 minutes sur table.
- ajouter 300 µl de P3 pour précipiter les membranes et débris cellulaires.
- centrifuger 20 minutes à 14000 rpm.
- récupérer le surnageant et ajouter 6 à 7 volumes (environ 630 µl) d'isopropanol afin de faire précipiter l'ADN.
- centrifuger 20 minutes à 14000 rpm.

5.6.1.3.Récupération de l'ADN.

- ôter le surnageant et ajouter 500 µl d'éthanol 70% afin de laver le culot,
- centrifuger 5 minutes à 14000 rpm,
- sécher 5 minutes au speed-vac,
- resuspendre dans 50 µl d'eau distillée et vortexer
- utiliser 15 µl pour la restriction diagnostique

5.6.2. Midipréparation d'ADN plasmidique des bactéries.

Cette méthode a pour but d'isoler une grande quantité d'ADN plasmidique présent dans une souche afin d'en obtenir un stock pour réaliser des constructions ultérieures ou des transformations, ou pour poursuivre les vérifications.

5.6.2.1.Culture des cellules.

- lancer des cultures de 200 ml de LB Amp, inoculées par 2% de précultures liquides.
- incuber une nuit à 37°C sous agitation.

5.6.2.2.Lyse des cellules.

- transvaser la culture dans un Sorval 250 ml.

- centrifuger les colonies, 10 minutes à 5000 rpm.
- ôter le surnageant et resuspendre le culot dans 4 ml de P1 RNAase afin d'éliminer l'ARN, transférer la solution dans un corex 30, ajouter 4 ml de P2 pour lyser les cellules. Laisser agir pendant 5 minutes à température de la pièce.
- ajouter 4 ml de P3 ou pour précipiter les membranes et débris cellulaires. Incuber 10 minutes sur glace.
- centrifuger 40 minutes à 13000 rpm à 4°C.
- récupérer le surnageant et le transférer dans un corex 30.
- centrifuger 10 minutes à 13000 rpm à 4°C.

5.6.2.3. Mise sur colonne.

- Préparation de la colonne Nucleobond AX100 : équilibrage de la colonne avec 2 ml de solution N2.
- déposer l'ADN sur la colonne et attendre que tout soit élué.
- laver deux fois avec 4 ml de N3.
- éluer l'ADN grâce à 2 ml de N5 dans un corex 15.
- ajouter 1,4 ml d'isopropanol afin de faire précipiter l'ADN.
- centrifuger 40 minutes à 13000 rpm à 4°C.
- éliminer le surnageant et rincer le culot au moyen de 1 ml d'éthanol 70%. Eliminer l'éthanol.
- sécher 5 minutes.
- resuspendre dans 70 µl d'eau et vortexer.

5.6.2.4. Quantification de l'ADN.

Elle s'effectue par une comigration sur gel d'une petite quantité de plasmide linéarisé avec un marqueur de taille et de concentration.

5.6.3. Préparation d'ADN plasmidique de levure.

Cette procédure permet de récupérer l'ADN plasmidique des clones positifs de levures issus du crible double hybride.

5.6.3.1. Culture des cellules.

- lancer des cultures de 10 ml de milieu riche, inoculées par un prélèvement de levure sur boîte.
- incuber une nuit à 30°C sous agitation.

5.6.3.2.Lyse des cellules.

- Centrifuger 1,5 ml de chaque préculture pendant 5 minutes à 3000 rpm à température ambiante,
- Oter le surnageant,
- Resuspendre les cellules dans un tampon de lyse « Breaking buffer » (200 µl),
- Ajouter 0,3 g de billes de verre d'un diamètre de 0,4 à 0,5 mm (environ 200 µl) et 200 µl de phénol/isoamylalcohol/chloroform (pH7,9),
- Vortexer chaque eppendorf 5X à grande vitesse,
- Centrifuger pendant 5 minutes à grande vitesse à température ambiante,
- Récupérer la phase supérieure aqueuse,
- Précipiter avec 2 volumes d'EtOH 70%,
- Centrifuger pendant 5 minutes à grande vitesse et garder le culot
- Sécher au speed-vac,
- Resuspendre dans 100 µl de TE.

5.6.3.3.Quantification de l'ADN.

Afin de quantifier l'ADN génomique récupéré, il faut mettre 10 µl de la solution finale sur gel avec 2 µl de bleu alourdisseur et faire migrer avec un marqueur de taille et de concentration.

5.7. La transformation

5.7.1.La transformation bactérienne

La transformation est une manipulation qui consiste en l'introduction dans une cellule d'un vecteur ou d'un fragment d'ADN linéaire. Il existe différents procédés pour rendre les cellules compétentes, c'est-à-dire réceptrices à cette introduction.

Il existe différentes procédures pour transformer les cellules bactériennes. Ces procédures présentent des efficacités différentes.

- la transformation utilisant le chlorure de calcium.
- l'électroporation

5.7.1.1.La transformation utilisant le chlorure de calcium.

1° principe.

Le calcium se lie à l'ADN plasmidique et le protège de l'action délétère des DNAases. Ce complexe ainsi formé précipite sur les membranes cellulaires. Suite à un choc thermique, la membrane se fragilise légèrement et de l'ADN peut pénétrer dans la cellule. Ces cellules potentiellement transformées sont placées dans un milieu non sélectif (ex : du LB) afin de favoriser l'expression des protéines de sélection encodées par des gènes portés sur le plasmide. Afin de sélectionner les cellules réellement transformées, celles-ci sont ensuite placées en culture sur milieu sélectif. Seules les cellules transformées par le plasmide pourront se développer sur ce milieu. L'efficacité de cette transformation est de 10^6 à $10^7/\mu\text{g}$ d'ADN pour les cellules DH10B de *E. coli*.

2° *préparation de cellules CaCl₂ compétentes.*

- inoculer une préculture de cellules d'*E. coli* DH10B de 50 ml de LB,
- laisser pousser toute la nuit à 37°C sous agitation,
- inoculer 400 ml de milieu LB avec 4 ml de la préculture dans un récipient stérile de 2 litres,
- incuber sous agitation à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O._{590nm} = 0,375 (délai de 2 à 3 heures),
- aliquoter la culture dans 8 tubes stériles de 50 ml,
- stopper la croissance dans la glace pendant 10 minutes,
- centrifuger 7 minutes à 3000 rpm à 4°C,
- ôter le surnageant et resuspendre les cellules dans 10 ml d'une solution de CaCl₂ froide,
- centrifuger les cellules 5 minutes à 2500 rpm à 4°C,
- resuspendre les cellules dans 2 ml de CaCl₂ froid,
- aliquoter par 200 µl dans des eppendorf refroidis et conserver à -70°C.

3° *Transformation proprement dite .*

- dégeler sur glace 200 µl de cellules compétentes,
- ajouter 10 ng de l'ADN plasmidique d'intérêt ,
- incuber 30 minutes sur glace,
- effectuer un choc thermique à 42°C pendant deux minutes,
- ajouter rapidement 1 ml de LB,
- incuber à 37°C pendant une demi-heure à une heure afin de permettre l'expression des protéines de sélection,
- - centrifuger 2-3 minutes à 6000 rpm, ôter le surnageant et resuspendre dans 200 µl de LB qui sont étalés sur boîte.

5.7.1.2. Transformation bactérienne par ELECTROPORATION

5.7.1.2.1. Principe

L'électroporation est actuellement la méthode la plus efficace de transformation bactérienne, comme elle permet d'obtenir de 10^9 à 10^{10} transformants par μg d'ADN.

L'application d'un champ électrique sur la membrane cellulaire des cellules compétentes augmente la perméabilisation momentanée de celles-ci et favorise ainsi le passage d'un plasmide si le voltage et la durée du choc sont suffisants. Pour éviter l'explosion de la suspension cellulaire soumise à l'électroporation, il faut essayer à réduire au minimum la force ionique de celle-ci, par des lavages successifs de la culture cellulaire avec de l'eau bidistillée. Après cette étape préliminaire, les cellules sont dites compétentes. De même, les échantillons plasmidiques sont dialysés avant d'être utilisés pour l'électroporation.

Nous avons utilisé l'électroporateur "Gene Pulser" couplé au « pulse controler » de Bio-Rad.

5.7.1.2.2. Préparation de cellules KC8 compétentes

- Inoculer une préculture de 5 ml de LB,
- Laisser pousser pendant la nuit sous agitation à 30 °C,
- Inoculer 1 ml de cette culture dans 100 ml de LB,
- Incuber à 30 °C jusqu'à une D.O.₅₉₅ se situant entre 0,4 et 0,8,
- Transférer dans 2 falcon 50 ml,
- Centrifuger pendant 10 minutes à 4000 rpm à 4 °C,
- Enlever le surnageant,
- Pooler les cellules resuspendues, dans un seul falcon,
- Laver 4 X à l'eau,
- Laver 1 X avec 50 ml de glycérol 10%,
- Centrifuger 10 minutes à 4000 rpm à 4°C,
- Resuspendre dans 1,5 ml de glycérol 10%, en gardant le tube sur glace,
- Les aliquots de 100 μl se conservent environ 6 mois à -80 °C.

Remarque: pour avoir des cellules compétentes, il est important de travailler à froid à chaque étape.

5.7.1.2.3. Electroporation

Pour l'électroporation, décongeler un aliquot sur glace et procéder comme suit:

- Placer les cuvettes d'électroporation dans la glace,
- Ajouter 50 μl de cellules compétentes dans chaque cuvette,
- Ajouter 5 μl d'ADN plasmidique dialysé à la première cuvette,

- Laisser le mélange pendant une minute sur glace,
- Electroporer à 25 μ F, 200 ohm, 2,1 KV,
- Ajouter sur-le-champ 1 ml de milieu de régénération (SOC),
- Transférer dans des eppendorf et laisser une heure à 37 °C,
- Etaler sur un milieu solide sélectif et placer la nuit à 37 °C.

5.7.2.La transformation de levure

5.7.2.1. La transformation utilisant le LiAc

1° PRINCIPE

Cette procédure permet de transformer des levures avec un ou plusieurs plasmides à la fois. Le PEG et le choc thermique perméabilisent la membrane. Le DNA SINGLE STRAND sperme de saumon augmente l'efficacité de transformation car il fonctionne comme "porteur" à l'ADN plasmidique. L'efficacité de transformation est estimée de 10^4 à 10^5 transformants par μ g d'ADN.

2° TRANSFORMATION

- inoculer 5 ml de milieu de sélection pour la levure et incubé sous agitation toute la nuit à 30°C.
- inoculer une culture de 20 ml du même milieu avec la préculture et incubé à 30°C sous agitation jusqu'à ce que la $D.O_{600} = 0,8$ (délai : entre 4 à 5 heures).

Pour deux transformations :

- transférer 10 ml de culture dans un falcon et centrifuger à 5000 rpm à température ambiante pendant 5 minutes. Oter le surnageant.
- resuspendre dans 10 ml d'eau stérile.
- centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à température ambiante. Oter le surnageant.
- resuspendre dans 200 μ l de LiAc 100 mM et transférer dans un eppendorf.
- microcentrifuger les cellules à haute vitesse 15 secondes et ôter le LiAc.
- resuspendre dans du LiAc de telle sorte que le volume total représente 100 μ l (le culot vaut environ 20 μ l).
- séparer en deux tubes, un pour chaque transformation.

Pour une transformation (pour un tube) :

- faire bouillir 50 μ l de SS DNA pendant 5 minutes et mettre sur glace.
- centrifuger à grande vitesse pendant 15 secondes et ôter le LiAc.
- ajouter le mix de transformation dans l'ordre mentionné ci-dessous car le PEG protège les cellules des effets néfastes des fortes concentrations de LiAc.

Le mix de transformation est :

- 240 μ l de PEG 50% (SIGMA 3350)
- 36 μ l de LiAc 1M
- 50 μ l de SS DNA (2 mg/ml)

- 25 µl d'ADN (0,1 à 1 mg/ml) à transformer
- vortexer chaque tube pendant une minute.
- incuber 30 minutes à 30°C.
- heat shock pendant 20 minutes dans un bain à 42°C.
- centrifuger à 6000 rpm pendant 15 secondes et ôter le mix de transformation.
- ajouter 200 µl d'eau stérile et resuspendre avec la pipette doucement.
- étaler sur milieu solide sélectif pour les intégrants. Etaler sur une boîte 50 µl et sur l'autre 150 µl de la transformation.

5.7.2.2. La transformation de levure pour un crible de banque.

5.7.2.2.1. Principe

Le principe est identique à celui exposé ci-dessus. L'efficacité de cette transformation est de 50000 à 100000 transformants par µg d'ADN.

5.7.2.2.2. Transformation

(protocole: <http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/units/biochem/gietz/2HS.html>)

-inoculer 50 ml de milieu de sélection pour la levure, à partir d'une préculture de 5 ml, et incuber sous agitation toute la nuit à 30°C.

-inoculer une culture de 150 ml du même milieu avec la préculture. La préculture doit être diluée pour obtenir une D.O._{600nm} = 0,3. Incuber à 30°C sous agitation jusqu'à ce que la D.O. _{600nm} = 0,75 (délai : entre 4 à 5 heures).

-L'idéal serait de diluer la culture le soir de façon à avoir une D.O._{600nm} de 0,75 le lendemain matin. Pour cela il faut connaître le temps de doublement exact de la souche.

-transférer en tubes de 50 ml (Falcon) et centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à température ambiante

-ôter le surnageant et laver le culot de cellules à l'eau stérile avec 1/2 du volume (soit 25 ml par falcon), centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à température ambiante. Ôter le surnageant.

-resuspendre dans 3 ml de LiAc 100mM par falcon, pooler les trois culots en un tube et laisser 15 minutes à 30°C.

-faire bouillir l'ADN de saumon

-sortir le falcon de 30°C et centrifuger pendant 5 minutes à 5000 rpm.

-Ôter le surnageant et mettre le mix de transformation dans cet ordre précis sur le culot cellulaire :

- 7200 µl de PEG 50% (SIGMA 3350)
- 1080 µl de LiAc 1M

- 1500 µl de SS DNA (2 mg/ml) bouilli pendant cinq minutes et mis sur glace auparavant
- 1020 µl d'eau – volume d'ADN à transformer
- 30 µl d'ADN
- vortexer le tout pendant une minute
- incuber 30 minutes à 30°C.
- heat shock pendant 40 minutes dans un bain à 42°C et mixer par inversion toutes les cinq minutes pour équilibrer la température d'un tel volume.
- centrifuger à 5000 rpm pendant 5 minutes et ôter le mix de transformation.
- Resuspendre dans un volume final de 9 ml avec de l'eau stérile doucement à la pipette. Le culot de cellules fait environ 2 ml.
- prendre 1 et 10 µl de cellules et les diluer dans 300 µl d'eau pour un contrôle d'efficacité.
- étaler 300 µl de cellules sur milieu solide sélectif pour les transformants

5.8. La PCR ou Polymerase Chain Reaction

5.8.1. Principe

La répétition de synthèses successives de DNA permet d'amplifier un fragment d'ADN, sans devoir le transformer dans un être vivant. La mise en œuvre de cette technique en 1985 permet d'amplifier un fragment d'ADN originellement présent en un seul exemplaire en des millions de copies.

Un programme PCR typique présente 3 étapes :

1. Etape de dénaturation : Elle se fait à 90°C, température nécessaire pour séparer les 2 brins d'ADN.

2. Etape d'"annealing" : La température descend à 55 °C, ce qui permet aux primers oligonucléotidiques de s'hybrider de façon spécifique avec les séquences anticomplémentaires.

3. Etape d'élongation : Cette étape se fait à 72 °C, ce qui constitue la température optimale pour la polymérase.

On amplifie l'ADN compris entre les deux amorces en présence de désoxynucléotides et d'une enzyme thermorésistante, la dynazyme ou Taq DNA Polymerase isolée de la bactérie *Thermus brockianus* qui allonge l'ADN de 5'en 3', ou la pfu (Statagene) isolée de *Pyrococcus furiosus*. Après une élongation des amorces sur base de la matrice à la température optimale d'action de l'enzyme, les deux brins (parental et néosynthétisé) sont dénaturés par chauffage et le cycle de température recommence. On recommence ce cycle un nombre de fois déterminé de telle sorte que l'amplification reste exponentielle. Le nombre d'amplicons est, en théorie, doublé à chaque cycle. Le produit de la PCR peut être utilisé pour le séquençage, ou pour l'analyse diagnostique de clones ou pour son insertion dans un vecteur. (Fig. 5.12)

5.8.2. Réalisation pratique.

Différents éléments doivent être mis en présence :

- l'ADN d'intérêt
- les déoxynucléotides : 4 μ l d'une solution concentrée 20 mmol/ μ l,
- les amorces oligonucléotidiques (concentration de 0,1nmol/ μ l: 5 μ l
- le tampon de PCR(10X) : 10 μ l,
- l'enzyme : 1 μ l (l'activité est de 2 unités/ μ l),
- l'eau stérile afin d'arriver au volume désiré de 100 μ l.

Un contrôle négatif doit être réalisé afin de vérifier si l'ADN amplifié n'est pas contaminé. Dans le tube de contrôle, tous les réactifs seront placés exception faite de l'ADN qui sera remplacé à volume égal par de l'eau stérile. Ce contrôle sera soumis au même processus de cycle de température que les autres tubes.

Une partie ou la totalité du produit PCR additionné de bleu alourdisseur est placé sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium afin de vérifier la taille de l'amplicon et, le cas échéant, de le récupérer.

5.9. Le séquençage automatique

5.9.1. Principe.

Le séquençage automatique se réalise au départ d'une élongation d'une chaîne d'ADN au départ d'un seul primer. Cette réaction utilise le principe de Sanger. (Sanger *et al.*, 1977). Au cours de la réaction, la polymérase ajoute des nucléotides triphosphates, soit des didéoxyribonucléotides (ddNTPs), soit des déoxyribonucléotides (dNTPs). Les didéoxyribonucléotides se distinguent des dNTPs par la présence en 3' d'un hydrogène à la place d'un hydroxyle. Ces didéoxyribonucléotides sont parfaitement reconnus par la polymérase et sont ajoutés à la chaîne en croissance. Cependant, la perte du groupement hydroxyle en 3' leur interdit toute nouvelle formation d'un lien entre nucléotides. En conclusion, toute incorporation d'un didéoxyribonucléotide dans une chaîne d'ADN met un terme à son élongation. En conséquence, comme l'incorporation d'un ddNTP plutôt que du dNTP correspondant est aléatoire, cette réaction permet la synthèse de chaînes d'ADN de longueurs variées. Le séquençage automatique permet d'établir la séquence de l'ADN en une seule réaction. En effet, chaque didéoxyribonucléotide est couplé de manière covalente à une molécule fluorescente de longueur d'onde déterminée. Celle-ci est spécifique du ddNTP utilisé. Le produit de la polymérisation est placé sur un gel de polyacrylamide en présence d'urée qui sépare sur base de leur taille, les différentes chaînes synthétisées. Au plus la chaîne d'ADN est

grande, au moins elle migre. Le séquenceur lit et identifie les nucléotides incorporés dans la chaîne et fournit la séquence grâce à la différence de longueur des chaînes et aux molécules fluorescentes.

5.9.2. Realisation pratique

Nous utilisons le kit "ABI PRISM dye terminator" (Perkin Elmer). Le protocole est optimisé pour tout thermocycler de type PE Applied Biosystems thermal cyclers.

5.9.2.1. La réaction de synthèse des fragments de taille variable.

Pour chaque réaction, ajouter les réactifs suivants dans l'ordre mentionné ci-dessous :

- Terminator Ready reaction mix contenant les dRhodamine terminators : 4 µl
- Matrice : ADN double brin (100 à 200 ng/ µl) : 1 à 4 µl
- Primer (0,001 ng/ µl) : 1,6 µl
- eau distillée pour aboutir à un volume total de 10 µl.

Bien mélanger et centrifuger brièvement.

Le programme de la réaction dure deux heures. Les étapes sont les suivantes pour l'appareil présent au laboratoire :

- augmentation rapide de température à 96°C pour dénaturer l'ADN.
- 96°C pendant 30 secondes.
- modification rapide de température pour atteindre 50°C pour hybrider les primers.
- 50°C pendant 15 secondes.
- rapide augmentation de température à 60°C pour allonger la chaîne de nucléotides.
- 60°C pendant 4 minutes.
- recommencer tout le cycle 25 fois.

5.9.2.2. La purification du produit

- Pour chaque réaction de séquençage, préparer un eppendorf qui contient 1 µl d'acétate de sodium 3 M pH 4,6 et 25 µl d'éthanol 95%.
- Ajouter à ce mix l'entièreté du produit et mélanger la solution.
- Vortexer les tubes et les placer sur la glace 10 minutes afin de précipiter les produits.
- Microcentrifuger à 4°C pendant 30 minutes à grande vitesse.
- Oter le surnageant et laver le culot avec 125 µl d'Ethanol 70%.
- Microcentrifuger 5 minutes à grande vitesse et ôter le surnageant.
- Sécher le culot au Speed vak pendant trois minutes.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.
- Bonnet, F., Vigneron, M., Bensaude, O. and Dubois, M.F. (1999) Transcription-independent phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) involves ERK kinases (MEK1/2). *Nucleic Acids Res*, **27**, 4399-4404.
- Buck, V., Russell, P. and Millar, J.B. (1995) Identification of a cdk-activating kinase in fission yeast. *Embo J*, **14**, 6173-6183.
- Carlson, M. (1997) Genetics of transcriptional regulation in yeast: connections to the RNA polymerase II CTD. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 1-23.
- Chang, E., Bartholomeusz, G., Pimental, R., Chen, J., Lai, H., Wang, L., Yang, P. and Marcus, S. (1999) Direct binding and In vivo regulation of the fission yeast p21-activated kinase shk1 by the SH3 domain protein scd2. *Mol Cell Biol*, **19**, 8066-8074.
- Chao, D.M., Gadbois, E.L., Murray, P.J., Anderson, S.F., Sonu, M.S., Parvin, J.D. and Young, R.A. (1996) A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature*, **380**, 82-85.
- Cismowski, M.J., Laff, G.M., Solomon, M.J. and Reed, S.I. (1995) KIN28 encodes a C-terminal domain kinase that controls mRNA transcription in *Saccharomyces cerevisiae* but lacks cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) activity. *Mol Cell Biol*, **15**, 2983-2992.
- Corden, J.L. and Patturajan, M. (1997) A CTD function linking transcription to splicing. *Trends Biochem Sci*, **22**, 413-416.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnatt, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P.R. and Kornberg, R.D. (2000) Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism [see comments]. *Science*, **288**, 640-649.
- Damagnez, V., Makela, T.P. and Cottarel, G. (1995) *Schizosaccharomyces pombe* Mop1-Mcs2 is related to mammalian CAK. *Embo J*, **14**, 6164-6172.
- De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O. and Kim, S.H. (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, **363**, 595-602.
- Drapkin, R. and Reinberg, D. (1994) The multifunctional TFIIF complex and transcriptional control. *Trends Biochem Sci*, **19**, 504-508.
- Feaver, W.J., Henry, N.L., Wang, Z., Wu, X., Svejstrup, J.Q., Bushnell, D.A., Friedberg, E.C. and Kornberg, R.D. (1997) Genes for Tfb2, Tfb3, and Tfb4 subunits of yeast transcription/repair factor IIF. Homology to human cyclin-dependent kinase activating kinase and IIF subunits. *J Biol Chem*, **272**, 19319-19327.

Bibliographie

- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Fromont-Racine, M., Rain, J.C. and Legrain, P. (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens [see comments]. *Nat Genet*, **16**, 277-282.
- Furnari, B.A., Russell, P. and Leatherwood, J. (1997) Pch1(+), a second essential C-type cyclin gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **272**, 12100-12106.
- Gilbreth, M., Yang, P., Bartholomeusz, G., Pimental, R.A., Kansra, S., Gadiraju, R. and Marcus, S. (1998) Negative regulation of mitosis in fission yeast by the shk1 interacting protein skb1 and its human homolog, Skb1Hs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14781-14786.
- Gilbreth, M., Yang, P., Wang, D., Frost, J., Polverino, A., Cobb, M.H. and Marcus, S. (1996) The highly conserved skb1 gene encodes a protein that interacts with Shk1, a fission yeast Ste20/PAK homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13802-13807.
- Gotoh, Y., Nishida, E., Shimanuki, M., Toda, T., Imai, Y. and Yamamoto, M. (1993) *Schizosaccharomyces pombe* Spk1 is a tyrosine-phosphorylated protein functionally related to *Xenopus* mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*, **13**, 6427-6434.
- Hampsey, M. (1998) Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 465-503.
- Hampsey, M. and Reinberg, D. (1999) RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 132-139.
- Hengartner, C.J., Myer, V.E., Liao, S.M., Wilson, C.J., Koh, S.S. and Young, R.A. (1998) Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell*, **2**, 43-53.
- Hermant, D., Pihlak, A., Westerling, T., Damagnez, V., Vandenhoute, J., Cottarel, G. and Makela, T.P. (1998) Fission yeast Csk1 is a CAK-activating kinase (CAKAK). *Embo J*, **17**, 7230-7238.
- Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J. and Pavletich, N.P. (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex [see comments]. *Nature*, **376**, 313-320.
- Kaldis, P., Sutton, A. and Solomon, M.J. (1996) The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell*, **86**, 553-564.
- Kim, Y.J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M.H. and Kornberg, R.D. (1994) A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*, **77**, 599-608.
- Kuchin, S. and Carlson, M. (1998) Functional relationships of Srb10-Srb11 kinase, carboxy-terminal domain kinase CTDK-I, and transcriptional corepressor Ssn6-Tup1. *Mol Cell Biol*, **18**, 1163-1171.

Bibliographie

- Kuchin, S., Yeghiayan, P. and Carlson, M. (1995) Cyclin-dependent protein kinase and cyclin homologs SSN3 and SSN8 contribute to transcriptional control in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4006-4010.
- Leclerc, V. and Leopold, P. (1996) The cyclin C/Cdk8 kinase. *Prog Cell Cycle Res*, **2**, 197-204.
- Leclerc, V., Tassan, J.P., O'Farrell, P.H., Nigg, E.A. and Leopold, P. (1996) Drosophila Cdk8, a kinase partner of cyclin C that interacts with the large subunit of RNA polymerase II. *Mol Biol Cell*, **7**, 505-513.
- Lee, J.M. and Greenleaf, A.L. (1991) CTD kinase large subunit is encoded by CTK1, a gene required for normal growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene Expr*, **1**, 149-167.
- Lee, J.M. and Greenleaf, A.L. (1997) Modulation of RNA polymerase II elongation efficiency by C-terminal heptapeptide repeat domain kinase I. *J Biol Chem*, **272**, 10990-10993.
- Leopold, P. and O'Farrell, P.H. (1991) An evolutionarily conserved cyclin homolog from *Drosophila* rescues yeast deficient in G1 cyclins. *Cell*, **66**, 1207-1216.
- Marcus, S., Polverino, A., Chang, E., Robbins, D., Cobb, M.H. and Wigler, M.H. (1995) Shk1, a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Ste20 and mammalian p65PAK protein kinases, is a component of a Ras/Cdc42 signaling module in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6180-6184.
- Maundrell, K. (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene*, **123**, 127-130.
- Moffat, J., Huang, D. and Andrews, B. (2000) Functions of Pho85 cyclin-dependent kinases in budding yeast [In Process Citation]. *Prog Cell Cycle Res*, **4**, 97-106.
- Morgan, D.O. (1996) The dynamics of cyclin dependent kinase structure. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 767-772.
- Morgan, D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 261-291.
- O'Brien, T., Hardin, S., Greenleaf, A. and Lis, J.T. (1994) Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature*, **370**, 75-77.
- Parvin, J.D. and Young, R.A. (1998) Regulatory targets in the RNA polymerase II holoenzyme. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 565-570.
- Patturajan, M., Conrad, N.K., Bregman, D.B. and Corden, J.L. (1999) Yeast carboxyl-terminal domain kinase I positively and negatively regulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain phosphorylation. *J Biol Chem*, **274**, 27823-27828.
- Rickert, P., Seghezzi, W., Shanahan, F., Cho, H. and Lees, E. (1996) Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. *Oncogene*, **12**, 2631-2640.

Bibliographie

- Roberts, S.G., Ha, I., Maldonado, E., Reinberg, D. and Green, M.R. (1993) Interaction between an acidic activator and transcription factor TFIIB is required for transcriptional activation. *Nature*, **363**, 741-744.
- Rodriguez, C.R., Cho, E.J., Keogh, M.C., Moore, C.L., Greenleaf, A.L. and Buratowski, S. (2000) Kin28, the TFIIF-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **20**, 104-112.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (1996) Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol*, **3**, 696-700.
- Sanchez, M., del Rey, F., Dominguez, A., Moreno, S. and Revuelta, J.L. (1999) DNA sequencing and analysis of a 40 kb region from the right arm of chromosome II from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **15**, 419-426.
- Sawin, K.E., Hajibagheri, M.A. and Nurse, P. (1999) Mis-specification of cortical identity in a fission yeast PAK mutant. *Curr Biol*, **9**, 1335-1338.
- Schaaff-Gerstenschlager, I., Mannhaupt, G., Vetter, I., Zimmermann, F.K. and Feldmann, H. (1993) TKL2, a second transketolase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning, sequence and deletion analysis of the gene [published erratum appears in *Eur J Biochem* 1994 Feb 1;219(3):1087]. *Eur J Biochem*, **217**, 487-492.
- Schaaff-Gerstenschlager, I. and Zimmermann, F.K. (1993) Pentose-phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of deletion mutants for transketolase, transaldolase, and glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Curr Genet*, **24**, 373-376.
- Serizawa, H., Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (1993) Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription. *Nature*, **363**, 371-374.
- Song, W. and Carlson, M. (1998) Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1. *Embo J*, **17**, 5757-5765.
- Spahr, H., Beve, J., Larsson, T., Bergstrom, J., Karlsson, K.A. and Gustafsson, C.M. (2000) Purification and characterization of RNA polymerase II holoenzyme from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **275**, 1351-1356.
- Sterner, D.E., Lee, J.M., Hardin, S.E. and Greenleaf, A.L. (1995) The yeast carboxyl-terminal repeat domain kinase CTDK-I is a divergent cyclin-cyclin-dependent kinase complex. *Mol Cell Biol*, **15**, 5716-5724.
- Svejstrup, J.Q., Vichi, P. and Egly, J.M. (1996) The multiple roles of transcription/repair factor TFIIF. *Trends Biochem Sci*, **21**, 346-350.
- Tassan, J.P., Jaquenoud, M., Leopold, P., Schultz, S.J. and Nigg, E.A. (1995) Identification of human cyclin-dependent kinase 8, a putative protein kinase partner for cyclin C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8871-8875.
- Tu, H., Barr, M., Dong, D.L. and Wigler, M. (1997) Multiple regulatory domains on the Byr2 protein kinase. *Mol Cell Biol*, **17**, 5876-5887.

Bibliographie

- Valay, J.G., Simon, M., Dubois, M.F., Bensaude, O., Facca, C. and Faye, G. (1995) The KIN28 gene is required both for RNA polymerase II mediated transcription and phosphorylation of the Rpb1p CTD. *J Mol Biol*, **249**, 535-544.
- Valay, J.G., Simon, M. and Faye, G. (1993) The kin28 protein kinase is associated with a cyclin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, **234**, 307-310.
- Verde, F., Wiley, D.J. and Nurse, P. (1998) Fission yeast orb6, a ser/thr protein kinase related to mammalian rho kinase and myotonic dystrophy kinase, is required for maintenance of cell polarity and coordinates cell morphogenesis with the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7526-7531.
- Vidal, M., Brachmann, R.K., Fattaey, A., Harlow, E. and Boeke, J.D. (1996a) Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10315-10320.
- Vidal, M., Braun, P., Chen, E., Boeke, J.D. and Harlow, E. (1996b) Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10321-10326.
- Xu, H.P., Wang, Y., Riggs, M., Rodgers, L. and Wigler, M. (1990) Biological activity of the mammalian RAP genes in yeast. *Cell Regul*, **1**, 763-769.
- Yang, P., Kansra, S., Pimental, R.A., Gilbreth, M. and Marcus, S. (1998) Cloning and characterization of shk2, a gene encoding a novel p21-activated protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem*, **273**, 18481-18489.
- Yang, P., Pimental, R., Lai, H. and Marcus, S. (1999) Direct activation of the fission yeast PAK Shk1 by the novel SH3 domain protein, Skb5. *J Biol Chem*, **274**, 36052-36057.

ANNEXES

Recherche des kinases apparentées à la CDK Cdc2 chez *S. pombe* par TBlastN

(http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/blast_server.shtml)

CDK	Pomblast (TBlastN)	P(N)
Sp Cdc2	Sp Cdc2	0.0
	SPCC16C4.11 PhoA	5.2e-83
	Mcs6	1.8e-57
	SPBC18H10.15 Pga	4.7e-57
	Prk1	1.4e-54
	SPAC2F3.15 SpCtk1	1.0e-52
	PIO14 Cdc2 homologue	1.8e-50
	Sty1	8.7e-49
	Spk1	2.1e-47

Les N° d'accession sont indiqués seulement pour les séquences non-caractérisées

Recherche des séquences apparentées à 3 CDKs potentielles non caractérisées de *S. pombe*

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

CDKs	TBlastN	P(N)
Sp PIO14 Cdc2 homologue (p38)	PIO14 Cdc2 homologue	0.0
	CDK9	5.0e-71
	Sc Sgv1	6.0e-69
SPBC18H10.15 Pga	SPBC18H10.15 Pga	0.0
	PITSURE	4.0e-30
SPCC16C4.11 PhoA	SPCC16C4.11 PhoA	0.0
	ScPho85	1.0e-92

Les N° d'accession sont indiqués seulement pour les séquences non-caractérisées

Recherche des kinases apparentées à **Srb10**, **Kin28** et **Ctk1**, les trois "C-type cyclin dependent kinase" de *S. cerevisiae* chez *S. pombe* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/blast_server.shtml) et dans toutes les séquences disponibles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

CDKs	Pomblast	P(N)	TBlastN	P(N)
Srb10	Prk1 Cdc2 SPBC18H10.15 Pga SPCC16C4.11 PhoA SPAC2F3.15 SpCtk1 PIO14 Cdc2 homologue Mcs6 Spm1 Sty1 Spk1	9.9e-97 1.1e-48 1.4e-44 2.5e-44 3.5e-42 1.6e-41 1.3e-38 5.3e-36 1.4e-30 6.4e-30	Srb10 CDK8	0.0 1.0e-66
kin28	Mcs6 SPBC18H10.15 Pga Cdc2 SPCC16C4.11 PhoA SPAC2F3.15 SpCtk1 Skp1 Spk1	2.7e-86 3.3e-56 5.6e-54 5.6e-54 1.8e-50 2.3e-41 3.7e-41	Kin28 Mcs6 CDK7	0.0 3.0e-89 3.0e-76
Ctk1	SPAC2F3.15 SpCtk1 PIO14 Cdc2 homologue SPBC18H10.15 Pga SPCC16C4.11 PhoA Cdc2 Mcs6 Prk1 Sty1 Spk1	2.2e-82 1.6e-58 4.7e-57 9.4e-52 2.5e-51 9.0e-47 1.3e-40 2.4e-39 4.0e-37	Ctk1 SPAC2F3.15 SpCtk1 CDK9	0.0 3.0e-63 1.0e-61

Les N° d'accession sont indiqués seulement pour les séquences non-caractérisées

Recherche des cyclines apparentées à Ccl1, Ctk2 et Srb11, les trois cyclines C de *S. cerevisiae* chez *S. pombe* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/blast_server.shtml) et dans toutes les séquences disponibles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

Cyclins	Pomblast	P(N)	TBlastN	P(N)
Ccl1	Mcs2	1.0e-36	Ccl1	0.0
	SPBC12D12.06 putative Cyclin C	8.3e-05	cyclin H	2.0e-18
	Pch1	0.17		
Ctk2	SPBC530.13 cyclin C homolog	6.3e-23	Ctk2	0.0
	Pch1	4.0e-08	cyclin C	0.55
Srb11	SPBC12D12.06 putative Cyclin C	7.8e-25	Srb11	0.0
	Pch1	1.2e-08	cyclin C	3.0e-22
	SPBC530.13 cyclin C homolog	9.8e-07		
	Mcs2	0.0014		

Les N° d'accession sont indiqués seulement pour les séquences non-caractérisées

Recherche des cyclines apparentées à Pch1
chez *S. cerevisiae* et dans toutes les séquences disponibles
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

Cyclin	Cereblast	P(N)	TBlastN	P(N)
Pch1	Srb11 Ctk2 Ccl1	8.0e-12 3.0e-07 5.0e-05	Pch1 cyclin K cyclin L cyclin T2 cyclin C	0.0 2.0e-28 1.0e-23 2.0e-22 2.0e-18

Les N° d'accession sont indiqués seulement pour les séquences non-caractérisées